

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. April 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/028516 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003165

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. September 2003 (23.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 44 453.6 24. September 2002 (24.09.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MENNE, Jan [DE/DE]; Phenomiques GmbH,
Feodor-Lynen-Str. 5, 30625 Hannover (DE). HALLER,
Hermann [DE/DE]; Medizinische Hochschule Hannover,
Carl-Neuberg Str. 1, 30625 Hannover (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

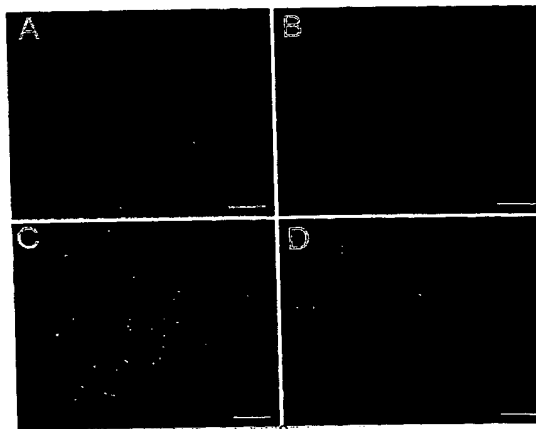
Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle
Bestimmungsstaaten

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: INHIBITION OF PROTEIN KINASE C ALPHA FOR TREATMENT OF DIABETES MELLITUS AND CARDIO-
VASCULAR DISEASES

(54) Bezeichnung: HEMMUNG DER PROTEINKINASE C ALPHA ZUR BEHANDLUNG VON DIABETES MELLITUS UND
KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN



AA Die immunohistochemische Untersuchung der Schnitte ergab, dass das
Heparansulfatproteoglycan bei diabetischen Kontrolltieren (B) nicht mehr oder kaum noch
nachweisbar war, jedoch bei diabetischen PKC α ^{-/-} Mäusen (D) in normaler Konzentration
gebildet wurde.

AA IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE SECTIONS INDICATED THAT HEPARAN SULPHATE
PROTEGLYCAN COULD NO LONGER OR COULD HARDLY BE DETECTED IN DIABETIC CONTROL
IN ANIMALS (B) YET WAS PRODUCED IN A NORMAL CONCENTRATION IN DIABETIC PKC α ^{-/-} MICE.

(57) Abstract: The invention relates to the use of agents impeding the expression and/or activity of protein kinase C-alpha (PKC- α),
especially for treatment of patients with diabetes and complications such as diabetic nephropathy, retinopathy or neuropathy.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Agenzien, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C-alpha (PKC- α) insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Diabetes um Komplikationen wie eine diabetische Nephropathie, Retinopathie oder Neuropathie zu verhindern.

Bezeichnung der Erfindung

Hemmung der Proteinkinase C Alpha zur Behandlung von
Diabetes mellitus und kardiovaskulärer Erkrankungen

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Agenzien, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) vermindern oder hemmen, zur Behandlung und/oder Prävention von koronarer Herzerkrankung, Herzinfarkt, peripherer Verschlusskrankheit, Schlaganfall, mit Proteinurie einhergehenden Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypertonus und kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie.

Diabetes mellitus ist einer der häufigsten Erkrankungen in der westlichen Welt, die ungefähr 5 % der Bevölkerung betrifft. Diabetes mellitus wird in einen Diabetes Typ I, welcher in der Regel bereits während der Jugend auftritt, und den auch als Alterszucker bezeichneten Diabetes Typ II unterteilt. Durch eine Störung des Glucosestoffwechsels kommt es bei beiden Diabetes-Formen zu dauerhaft erhöhten Glucosewerten im Blut, was bei den betroffenen Patienten nach mehreren Jahren zu unterschiedlichen Komplikationen führt. Die häufigsten und gleichzeitig am meisten gefürchteten Komplikationen sind die diabetische Retinopathie, welche zur Erblindung führt, die diabetische Neuropathie, welche Fuß- oder Beinamputation nach sich ziehen kann, und die diabetische Nephropathie.

Eine diabetische Nephropathie entwickelt sich bei ungefähr 40 % aller Diabetes-Patienten und ist weltweit die häufigste Ursache für ein chronisches Nierenversagen und eine Dialysebehandlung. Etwa 30 bis 40 % aller neuen Dialysepatienten weisen eine diabetische Nephropathie auf. Da sich die diabetische Nierenschädigung nur langsam entwickelt, ist es von großer klinischer Bedeutung, bereits frühzeitig Patienten zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko tragen, eine Niereninsuffi-

zienz zu entwickeln, um geeignete therapeutische Schritte einzuleiten. Eines der ersten klinischen Zeichen einer beginnenden Nierenschädigung ist das Auftreten einer sogenannten Mikroalbuminurie. Dabei kommt es zu einer Ausscheidung von 30-300 mg Albumin im 24-Stunden-Sammelurin.

5 Im Normalfall werden weniger als 30 mg Albumin pro Tag ausgeschieden. Eine Mikroalbuminurie tritt unter den gegenwärtigen therapeutischen Bedingungen bei etwa 25 % der Diabetiker mit Diabetes Typ I oder Typ II auf (Alzaid, Diabetes Care, 19 (1996), 79-89; Klein et al., Diabetes Care, 22 (1999), 743-751; Valmadrid et al., Arch. Intern. Med., 10
10 160 (2000), 1093-1100). Das Risiko, dass sich eine Niereninsuffizienz entwickelt, ist bei Patienten mit Mikroalbuminurie etwa 10-mal höher als bei Patienten mit normaler Albuminausscheidung. Eine diabetische Nephropathie, welche durch eine Proteinurie von mehr als 300 mg/Tag und/oder eine eingeschränkte Nierenfunktion gekennzeichnet ist, entwi-
15 ckelt sich bei etwa 5 bis 10 % aller Patienten mit Diabetes und Mikroalbuminurie pro Jahr. Auch das Risiko, dass sich eine diabetische Retinopathie entwickelt, ist bei Diabetikern mit Mikroalbuminurie im Vergleich zu Diabetikern ohne Mikroalbuminurie erheblich gesteigert (Vigstrup und Mogensen, Acta Ophthalmol. (Copenh), 63 (1985), 530-
20 534).

Wie Langzeitstudien mit mehr als zehnjährigem Follow-up zeigten, ist die kardiovaskuläre Mortalität bei Typ II- und Typ I-Diabetiker bereits im Stadium der Mikroalbuminurie im Vergleich zu Diabetikern ohne Mikroalbuminurie etwa zweifach erhöht, auch nach Adjustierung für die
25 konventionellen Risikofaktoren wie Cholesterin und Hypertonie (Rossing et al., Bmj, 313 (1996), 779-784; Gerstein et al., Diabetes Care, 23 (2000), Suppl. 2: B35-39; Valmadrid et al., 2000). Eine gesteigerte kardiovaskuläre Mortalität ist auch bei Patienten mit Mikroalbuminurie ohne Diabetes mellitus nachzuweisen (Gerstein et al., Jama, 286
30 (2001), 421-426).

Es gibt verschiedene Hypothesen, warum die Mikroalbuminurie ein äußerst wichtiger Marker für die Entstehung von Komplikationen bei Patienten mit Diabetes ist. Gemäß der sogenannte "Steno-Hypothese" (Deckert, Feldt-Rasmussen et al., Diabetologia, 32 (1989), 219-226) ist
35 der Verlust von negativ, also anionisch, geladenen Molekülen in der

extrazellulären Matrix verantwortlich für die Entstehung von Albuminurie, diabetischer Retinopathie und kardiovaskulärer Komplikationen, beispielsweise koronarer Herzerkrankung. Diese Hypothese stützt sich auf sowohl am Menschen als auch an tierischen Modellsystemen erhobenen Daten und ist in den letzten Jahren durch Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen bestätigt worden.

In der Niere wird der Urin in den Nierenkörperchen, den sogenannten Glomeruli, abgepresst. Um das Durchtreten von Eiweißen, beispielsweise Albumin, zu verhindern, ist die Blutseite von der Urinseite durch eine als Basalmembran bezeichnete Membran getrennt. Die Basalmembran weist kleine Poren auf, die kleineren Molekülen den Durchtritt durch die Basalmembran ermöglichen, während Eiweißmoleküle aufgrund ihrer Größe die Membran nicht passieren können. Bei Patienten mit Mikroalbuminurie kommt es dennoch zum Durchtritt kleiner Eiweiße wie Albumin, obwohl die Porengröße zunächst nicht zunimmt. Als Erklärung für dieses Phänomen konnte gezeigt werden, dass in den Poren beziehungsweise am Porenrand Moleküle negativer Ladung vorhanden sind, welche die ebenfalls negativ geladenen Eiweiße abstoßen (Kverneland, Feldt-Rasmussen et al., *Diabetologia*, 29 (1986), 634-639; Deckert, Feldt-Rasmussen et al., *Kidney Int.*, 33 (1988), 100-106; Kverneland, Welinder et al., *Diabetologia*, 31 (1988), 708-710). Bei diesen Molekülen mit negativen Ladungen handelt es sich um Proteoglycane. Proteoglycane sind komplexe Makromoleküle, die aus Proteinen bestehen, an die kovalent Polysaccharid-Ketten angelagert sind. Die Polysaccharid-Ketten bestehen überwiegend aus Heparansulfat und sind stark negativ geladen. Das im Körper am häufigsten vorkommende Proteoglycan ist Perlecan. Perlecan ist ein 460 kd großes Protein und hat mehrere Polysaccharid-Seitenketten (Murdoch und Iozzo, *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, 423 (1993), 237-242; Iozzo, Cohen et al., *Biochem. J.*, 302 (1994), 625-639; Murdoch, Liu et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 42 (1994), 239-249). Bei Patienten mit Diabetes und Mikroalbuminurie ist Heparansulfat in der glomerulären Basalmembran kaum vorhanden. Auch bei Patienten mit fortgeschrittener diabetischer Nephropathie lässt sich Heparansulfat nicht mehr in der Basalmembran nachweisen, obwohl die Proteinketten noch vorhanden sind. Dieser Effekt wird durch eine verminderte Heparansulfatsynthese unter hyperglykämischen Bedingungen, wie sie

bei Diabetikern vorkommen, erklärt (Parthasarathy und Spiro, Diabetes, 31 (1982), 738-741; Deckert, Feldt-Rasmussen et al., 1988; Nakamura und Myers, Diabetes, 37 (1988), 1202-1211; Nerlich und Schleicher, Am. J. Pathol., 139 (1991), 889-899; Makino, Ikeda et al., Nephron, 61 (1992), 415-421; Scandling und Myers, Kidney Int., 41 (1992), 840-846; Vernier, Steffes et al., Kidney Int., 41 (1992), 1070-1080; Tamsma, van den Born et al., Diabetologia, 37 (1994), 313-320; Iozzo und San Antoniom, J. Clin. Invest., 108 (2001), 349-355). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Heparansulfat-Proteoglycane nicht nur die glomeruläre Filtration von Albumin durch die negative Ladung verhindern, sondern wahrscheinlich auch für die Integrität der Porengröße innerhalb der Basalmembran mitverantwortlich sind (Deckert, Kofoed-Enevoldsen et al., Diabetologia, 36 (1993), 244-251). So führt der Verlust von Heparansulfat-Proteoglycanen mit Fortschreiten der Niereninsuffizienz zu einer Zerstörung der Mikrostruktur der Basalmembran. Diese Veränderungen könnten erklären, weshalb es im Verlauf der diabetischen Nephropathie zu einer großen, nicht-selektiven Proteinurie mit Verlust von größeren Proteinen wie Immunglobulin kommt. Heparansulfat-Proteoglycane sind auch starke Inhibitoren der mesangialen Expansion im Nierenkörperchen. Dies ist von großem Interesse, da es bei Diabetes-Patienten klassischerweise zu einer Expansion des mesangialen Bindegewebes kommt. Es ist daher nicht überraschend, dass der Heparansulfat-Proteoglykan-Verlust bei Diabetes-Patienten als eine wichtige Ursache für die mesangiale Expansion angeschuldigt wird.

Der Verlust von Heparansulfat tritt bei Diabetikern jedoch nicht nur in der Niere auf, sondern in fast allen anderen Organen. So kommt es zu einer deutlichen Verminderung von Heparansulfat im Bindegewebe der Retina, des Skelettmuskels, der Arterienwände und der Haut sowie auf roten Blutkörperchen. Auch Endothelzellen weisen eine verminderte Synthese von Heparansulfat auf (Yokoyama, Hoyer, et al., Diabetes, 46 (1997), 1875-1880; van der Pijl, Daha et al., Diabetologia, 41 (1998), 791-798). Da Heparansulfat-Proteoglycane wichtige antithrombotische Eigenschaften aufweisen, kann der Verlust von Heparansulfat-Proteoglycanen zu der Entstehung von Mikrothromben, beispielsweise in den Netzhautgefäßen, beitragen und somit die Entstehung einer diabetischen Retinopathie begünstigen (Marcum, Fritze et al., Am. J. Physi-

ol., 245 (1983), H275-33; Marcum, McKenney et al., J. Clin. Invest., 74 (1984), 341-350; Marcum und Rosenberg, Biochemistry, 23 (1984), 1730-1737; Marcum, Atha et al., J. Biol. Chem., 261 (1986), 7507-7517). Weitere wichtige antiatherosklerotische Funktionen von Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) bestehen darin, dass HSPG die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen hemmen, wodurch es zur Entstehung von arteriellen Gefäßläsionen kommt. HSPG hemmen ferner die Bindung von Monozyten (Entzündungszellen) an das subendotheliale Bindegewebe. HSPG hemmen auch die subendotheliale Bindung und Ablagerung von Lipoprotein a und oxidierten LDL, welche eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose haben. HSPG sind auch wichtige Regulatoren bei der Angiogenese, das heißt bei der Ausbildung von neuen Gefäßen in geschädigten Körperbereichen (Rosenberg, Shworak et al., J. Clin. Invest., 100 (1997), S67-75; Pillarisetti, Trends Cardiovasc. Med., 10 (2000), 60-65; Iozzo und San Antonio, 2001). Der Verlust von Heparansulfat-Proteoglykan ist daher nicht nur bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie und der diabetischen Retinopathie von Bedeutung, sondern auch bei der Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen.

Ein weiterer Aspekt ist, dass es bei Patienten mit Hypertonie zu einer Mikroalbuminurie kommt. Bislang wurde dieses Phänomen über einen erhöhten Druck in den Nierenkörperchen erklärt, wobei angenommen wurde, dass vermehrt Albumin "abgequetscht" wird. Wenn dies jedoch zutrifft, muss davon ausgegangen werden, dass Patienten mit gleichbleibend hohem arteriellen Blutdruck ebenfalls ein hohes kardiovaskuläres Risiko haben, unabhängig davon, ob sie eine Mikroalbuminurie aufweisen. Dies trifft jedoch nicht zu, wie in mehreren prospektiven Untersuchungen gezeigt werden konnte. Hypertensive Patienten mit Mikroalbuminurie haben eine etwa zweifach höhere kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität als ähnlich hypertensive Patienten mit ansonsten vergleichbarem Risikoprofil, beispielsweise Hypercholesterinämie, Raucheranamnese und Diabetes (Sleight, J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst., 1 (2000), 18-20; Crippa, J. Hum. Hypertens., 16 (Suppl. 1) (2002), S74-7; Diercks, van Boven et al., Can. J. Cardiol., 18 (2002), 525-535). Dementsprechend ist die Mikroalbuminurie ein unabhängiger Risikoparameter für die Entstehung und Prognose von kardiovaskulären Erkrankungen. Dies lässt sich nur damit erklären, dass es bei Patienten mit Mikroal-

buminurie zu einer Veränderung im gesamten Gefäßsystem kommt. Bislang ist jedoch unklar, welche Störung bei Patienten mit Hypertonie der Mikroalbuminurie zugrunde liegt.

5 Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht darin, Mittel bereitzustellen, die zur Therapie von Mikroalbuminurie, insbesondere bei Patienten mit Diabetes mellitus und Patienten mit Hypertonie, eingesetzt werden können, um die mit Diabetes assoziierten Spätschäden, insbesondere diabetische Retinopathie, diabetische Nephropathie und diabetische Neuropathie, und kardiovaskulären Komplikationen sowie die mit Hypertonie assoziierten kardiovaskulären Komplikationen zu behandeln und/oder diesen vorzubeugen.

10 Die vorliegende Erfindung löst das ihr zugrundeliegende technische Problem durch die Lehre, zur Behandlung und/oder Prävention von Gefäß-Krankheiten, Herz-Kreislauf-Krankheiten, mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypotonie und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie Agenzien zu verwenden, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) vermindern oder hemmen.

20 Im Stand der Technik wurde bislang angenommen, dass die β 2-Isoform der Proteinkinase C für die Entstehung der diabetischen Komplikationen verantwortlich ist. Zum einen wird die β 2-Isoform im Gewebe diabetischer Tiere vermehrt produziert (Inoguchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992), 11059-11063) und zum anderen führt der Proteinkinase C- β -spezifische Inhibitor LY333531 bei Nagetieren mit Typ I- und Typ II-Diabetes zu einer geringeren Proteinurie als Zeichen einer verminderten Nierenschädigung (Ishii et al., J. Mol. Med., 76 (1998), 21-31; Koya et al., Faseb J., 14 (2000), 439-447).

30 Erfindungsgemäß erzeugte Proteinkinase C- α -„knock out“-Mäuse, die keine Proteinkinase C- α bilden können, entwickelten überraschenderweise nach Induktion eines Diabetes mittels Streptozotocin keine Albuminurie. Hingegen entwickelten Kontrolltiere, die die bis auf die Veränderung der Proteinkinase C- α -Expression genetisch weitgehend identisch

waren, eine deutliche Albuminurie. Die weitere Untersuchung der „knock out“-Tiere ergab erfindungsgemäß vollkommen überraschend, dass die Tiere unter diabetischen Bedingungen in der Lage waren, Heparansulfat in normaler Konzentration zu bilden. Hingegen konnten die Kontrolltiere unter diabetischen Bedingungen kaum noch Heparansulfat bilden.

Erfindungsgemäß durchgeführte histologische Untersuchungen ergaben weitere signifikante Veränderungen bei den Proteinkinase C- α -„knock out“-Mäusen. Unter Verwendung immunhistochemischer Verfahren konnte erfindungsgemäß gezeigt werden, dass das Fehlen der Proteinkinase C- α weitere gravierende Unterschiede in der Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) und des dazugehörigen Rezeptors (VEGF-R II) nach sich zieht. Während bei diabetischen Kontrolltieren ein signifikanter Anstieg der exprimierten Mengen von VEGF und des VEGF R II-Rezeptors nachgewiesen werden konnte, wurde bei den Proteinkinase C- α -„knock out“-Tieren ein deutlich geringerer Anstieg der exprimierten Mengen von VEGF und des VEGF R II-Rezeptors festgestellt. Dieses Ergebnis ist sofern von immenser Bedeutung, als eine gesteigerte VEGF-Expression als einer der wichtigsten Mediatoren für die Entstehung einer diabetischen Retinopathie angesehen wird (Aiello und Wong, Kidney Int. Suppl., 77 (2000), S113-9; Benjamin, Am. J. Pathol., 158 (2001), 1181-1184).

Aus den erfindungsgemäßen Ergebnissen ergibt sich, dass der Proteinkinase C- α bei der Regulation der Heparansulfat-Proteoglykan-Bildung und bei der Ausprägung einer Proteinurie eine zentrale Rolle zukommt. Die erfindungsgemäßen Ergebnisse zeigen auch, dass der Proteinkinase C- α bei der Manifestation der Proteinurie eine erheblich wichtigere Rolle als der Proteinkinase C- β zukommt, wobei die Proteinkinase C- β allerdings offensichtlich in der Lage ist, zumindest einen Teil der Funktionen der Proteinkinase C- α zu übernehmen. Die erfindungsgemäßen Ergebnisse zeigen ferner, dass eine Hemmung der Proteinkinase C- α -Isoform sowohl gezielt Schutz vor der Entwicklung diabetischer Spätfolgen, wie diabetischer Nephropathie, diabetischer Retinopathie und/oder kardiovaskulärer Komplikationen, als auch gezielt Schutz vor der Entwicklung von Erkrankungen bietet, die mit Proteinurie einhergehen.

Erfindungsgemäß ist also vorgesehen, zur Behandlung und/oder Prävention von Gefäß-Krankheiten, Herz-Kreislauf-Krankheiten, mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypotonie und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie Agenzien zu verwenden, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) vermindern oder hemmen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Krankheiten“ oder „Erkrankungen“ Störungen der Lebensvorgänge in Organen oder im gesamten Organismus mit der Folge von subjektiv empfundenen beziehungsweise objektiv feststellbaren körperlichen, seelischen beziehungsweise geistigen Veränderungen verstanden. Unter „Komplikationen“ oder „Spätschäden“ werden Folgeerkrankungen oder Sekundärkrankheiten verstanden, das heißt eine zu einem primären Krankheitsbild hinzutretende zweite Erkrankung.

Erfindungsgemäß handelt es sich bei den zu behandelnden Krankheiten insbesondere um Gefäß-Krankheiten, Herz-Kreislauf-Krankheiten, mit Proteinurie assoziierte Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus mit und ohne assoziierte Spätschäden und/oder kardiovaskuläre Komplikationen, Hypertonie mit und ohne assoziierte kardiovaskuläre Komplikationen und/oder Hypercholesterinämie mit und ohne assoziierte kardiovaskuläre Komplikationen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Gefäß-Krankheiten“ oder „Gefäß-Erkrankungen“ insbesondere Krankheiten der Arterien verstanden, die zu funktionellen oder organischen Durchblutungsstörungen führen. In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist die Gefäß-Krankheit eine periphere arterielle Verschlusskrankheit. Unter einer „arteriellen Verschlusskrankheit“ wird eine Erkrankung verstanden, die durch stenosierende beziehungsweise obliterierende Veränderungen an den Arterien verursacht werden und zu Durchblutungsstörungen mit Ischämie in versorgungsabhängigen Geweben oder Organen führen. Bei Diabetes mellitus kommt es insbesondere zu chronischen

Verschlusskrankheiten, die unter anderem durch obliterierende Arteriosklerose, auch Angiopathien und Angioneuropathien, verursacht werden.

Unter „Herz-Kreislaufkrankheiten“ werden Krankheiten und Störungen verstanden, die die Funktion von Herz und Kreislauf, beispielsweise den Füllungszustand und Tonus des Kreislaufsystems, die Auswurfleistung des Herzens, die neuralen und humoralen Kopplungsmechanismen zwischen Herz und Kreislauf etc. betreffen. In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den Herz-Kreislauf-Erkrankungen um koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt und Schlaganfall.

10 Unter „koronarer Herzerkrankung“ wird die klinische Manifestation einer primären Koronarinsuffizienz verstanden, wobei es durch Einengung oder Verschluss von Herzkranzgefäßen zu einer Verminderung der Durchblutung und damit der Zufuhr von energieliefernden Substraten und Sauerstoff zum Herzmuskel kommt.

15 Unter einem „Herzinfarkt“ wird die Nekrose eines umschriebenen Herzmuskelbezirks, die meistens akut als Komplikation bei chronischer koronarer Herzkrankheit auftritt, verstanden. Die Ursache für einen Herzinfarkt sind anhaltende kritische Mangel durchblutung bei Koronarinsuffizienz und länger andauernden Koronargefäßspasmen insbesondere
20 im Bereich einer vorbestehenden exzentrischen Koronarstenose. Der Herzinfarkt manifestiert sich häufig bei körperlicher oder psychischer Belastung infolge der Steigerung des Sauerstoffbedarfs des Herzmuskels oder bei akuter Unterbrechung der Blutversorgung.

Unter „Schlaganfall“ oder „Apoplexie“ wird ein ichämischer Hirninfarkt
25 infolge partieller Durchblutungsstörung des Gehirns verstanden. Der Schlaganfall wird durch Embolien verursacht, die von arteriosklerotischen Veränderungen extrakranieller Gefäße oder vom Herzen ausgehen, seltener infolge einer Stenose oder zerebraler Mikroangiopathien.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen“ insbesondere parenchymatöse
30 Nierenerkrankungen verstanden, die durch das Vorhandensein von Eiweißen im Harn charakterisiert sind. Bei der Proteinurie kann es sich um eine glomeruläre Proteinurie, eine tubuläre Proteinurie oder eine glo-

merulär-tubuläre Mischproteinurie handeln. Die ausschließlich renale Ausscheidung von Albumin und Transferrin charakterisiert die selektive Proteinurie, die beispielsweise bei Minimal-change-Nephropathie auftritt. Bei der nicht-selektiven Proteinurie ist auch IgG im Harn nachweisbar. Diese Proteinurie-Form ist beispielsweise bei Nierenamyloidose zu finden, aber auch im fortgeschrittenen Stadium der diabetischen Nephropathie. Einer tubulären Proteinurie liegen tubulointerstielle Erkrankungen zugrunde, die reabsorptive Prozesse beeinträchtigen, was die Exkretion niedermolekularer Proteine zur Folge hat. Klinisch ist die tubuläre Proteinurie insbesondere dann bedeutsam, wenn sie mit anderen Defekten des proximalen Tubulus assoziiert ist. Tubuläre Proteinurien kommen unter anderem bei Erkrankungen wie hereditärer Tubulopathie, renal-tubulärer Azidose, bakteriell oder medikamentös induzierter interstitieller Nephritis, akutem Nierenversagen, Schwermetallvergiftungen, Bence-Jones-Nephropathie und in der postoperativen Phase der Nierentransplantation vor. Der glomerulär-tubulären Mischproteinurie liegen häufig primäre glomeruläre Erkrankungen mit ausgeprägten sekundären interstitiellen Veränderungen zugrunde.

In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung handelt es sich daher bei den mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen insbesondere um Minimal-change-Nephropathie, sonstige Glomerulopathien, Nierenamyloidose, hereditäre Tubulopathie, renal-tubuläre Azidose, medikamentös oder bakteriell induzierte interstitielle Nephritis, akutes Nierenversagen, Bence-Jones-Nephropathie und die postoperative Phase einer Nierentransplantation.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Diabetes mellitus“ verschiedene Formen der Glycose-Stoffwechselstörung mit unterschiedlicher Ätiologie und Symptomatik verstanden. Gemeinsames Kennzeichen ist ein relativer oder absoluter Mangel an Insulin. Diabetes mellitus-Erkrankungen sind durch eine dauerhafte Erhöhung der Blutglucose (Hyperglykämie) oder durch eine zeitlich inadäquate Verwertung zugeführter Glucose gekennzeichnet. Der Diabetes mellitus wird in Typ I (IDDM) und Typ II (NIDDM) unterteilt.

Diabetes-spezifische und Diabetes-assoziierte chronische Komplikationen sind Mikroangiopathie, wie Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie, Polyneuropathie, diabetischer Fuß, Störung des Skelett-, Stütz- und Bindegewebes sowie Magroangiopathie, insbesondere koronare Herzkrankung, cerebrale Durchblutungsstörung und periphe arterielle Verschlusskrankheit.

Unter „diabetischer Retinopathie“ wird eine bei Diabetes mellitus auftretende Mikroangiopathie des Augenhintergrundes verstanden. Formen der diabetischen Retinopathie sind die nicht-proliferative Retinopathie (Hintergrundretinopathie), wie Netzhautblutungen, Mikroaneurysmen, harte Exsudate, Netzhautödem mit Sehschärfenverlust, sowie die proliferative Retinopathie, wobei es zum zusätzlichen Auftreten von Cotton-wool-Herden und Gefäßneubildungen auf und vor der Netzhaut mit Glaskörperblutungen infolge Netzhautischämie durch Gefäßverschlüsse kommt. Die proliferative Retinopathie kann zu Traktionsamotio, neovaskulärem Glaukom und Erblindung führen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „diabetischer Nephropathie“, die auch als diabetische Glomerulosklerose bezeichnet wird, eine Schädigung der glomerulären Nierenkapillaren verstanden. Klinisch äußert sich die diabetische Nephropathie durch Proteinurie, Hypertonie, Ödeme, eine diffuse Verbreiterung der Basalmembran, eine Zunahme des Mesangiums und spätere knötchenartige Verdickungen in den Glomerulusschlingen mit Einengung des Gefäßlumens sowie fibrinoide Ablagerungen in der Kapillarwand und Mikroaneurysmen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „diabetischen Neuropathie“ eine Erkrankung der peripheren Nerven verstanden. Insbesondere handelt es sich dabei um die symmetrische distale sensomotorische Polyneuropathie und die autonome Neuropathie. Die periphere Polyneuropathie manifestiert sich typischerweise an den unteren Extremitäten, beginnend an den Füßen, und schreitet nach proximal weiter und betrifft nicht selten auch die Arme. Die Symptomatologie variiert erheblich, wobei Beschwerden wie Schmerzen, Taubheitsgefühl und Parästhesien häufig zu einer Exazerbation führen.

Unter kardiovaskulären Komplikationen bei Diabetes werden erfindungsgemäß Herz-Kreislauf- und Gefäßerkrankungen, insbesondere periphere Verschlusskrankheit, koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall verstanden, die infolge von Diabetes mellitus auftreten.

- 5 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „Hypertonie“ oder „Hypertonus“ Bluthochdruck oder Hochdruckkrankheit verstanden, der/die durch eine dauernde Erhöhung des Blutdruckes auf Werte von systolisch von mehr als 140 mmHG und diastolisch von mehr als 90 mmHG gekennzeichnet ist. Unter „mit Hypertonie assoziierten kardiovaskulären Komplikationen“ werden erfindungsgemäß Herz-Kreislauf- und Gefäß-
10 erkrankungen, insbesondere periphere Verschlusskrankheit, koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall verstanden, die infolge von Hypertonie auftreten.

- Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „Hypercholesterinämie“ eine erhöhte Cholesterin-Konzentration im Blut verstanden, wobei die Hypercholesterinämie primär oder sekundär infolge von Diabetes auftreten kann. Hypercholesterinämie ist ein Risikofaktor für Arteriosklerose. Unter „mit Hypercholesterinämie assoziierten kardiovaskulären Komplikationen“ werden erfindungsgemäß Herz-Kreislauf- und
15 Gefäßerkrankungen, insbesondere periphere Verschlusskrankheit, koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall verstanden, die infolge von Hypercholesterinämie auftreten.

- Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „Proteinkinase C“ oder „PKC“ eine Proteinfamilie verstanden, die bei der Signalübertragung eine essentielle Rolle spielt, wobei die PKC-Proteine durch Phosphorylierung von Substraten, wie Enzymen, Transkriptionsfaktoren und/oder Cytoskelett-Proteinen intrazellulär regulatorische Funktionen ausüben. Die Aktivierung der PKC-Proteine führt beispielsweise zu einer Aktivierung weiterer Proteinkinasen einschließlich der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), die somit
25 ein Substrat der PKC-Proteine sind. Proteinkinase C-Proteine sind die Haupt-Phorbol ester-Rezeptoren. Die Proteinkinase C-Proteinfamilie umfasst mindestens zwölf Isoformen in Säugerzellen, die in drei unterschiedliche Subfamilien unterteilt werden. Die sogenannten herkömmli-
30

chen (conventional) Proteinkinase C-Isoformen (cPKC) umfassen die Isoformen PKC- α , PKC- β I und die Spleißvariante β II sowie PKC-gamma. Die sogenannten neuen Proteinkinase-Isoformen (nPKC) umfassen die Isoformen PKC-delta, PKC-epsilon, PKC-eta und PKC-theta. Die sogenannten atypischen Proteinkinase C-Isoformen (aPKC) umfassen die Isoformen PKC-zeta und PKC-lambda (auch als PKC-iota bekannt). Weitere Isoformen sind PKC-mu (auch als Proteinkinase D bezeichnet) sowie die PKC-verwandten Kinasen (PRK), die eventuell eigene Subfammlilien darstellen (Toker, Frontiers in Biosciences, 3 (1998), d1134-1147). Die PKC-Isoformen unterscheiden sich sowohl in ihren Aminosäuresequenzen als auch in den die Aminosäuresequenzen codierenden Nucleinsäuresequenzen (Coussens et al., Sciences, 233 (1986), 859-866). Die PKC-Proteine weisen allesamt eine Domänenstruktur auf. Auch ihre zellulären Expressionsmuster, die Mechanismen ihrer Aktivierung und ihre Substratspezifität unterscheiden sich.

Die Mehrzahl der Proteinkinase C-Isoformen ist vor Aktivierung nicht membrangebunden und ist im Cytoplasma diffus verteilt. Die Aktivierung der Aktivität jeder Isoform durch Behandlung der Zellen mit der Phorbol-Verbindung 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat führt zu Isozymspezifischen Veränderungen der Zellmorphologie sowie zu einer schnellen selektiven Umverteilung der verschiedenen PKC-Isozyme in verschiedene subzelluläre Strukturen. Die Proteinkinase C- α -Isoform reichert sich insbesondere im endoplasmatischen Retikulum und am Zellrand an, während die PKC- β II-Isoform in den actinreichen Mikrofilamenten des Cytoskeletts angereichert wird. Die Substratspezifität der PKC-Isoformen wird zumindest teilweise durch die subzelluläre Verteilung der aktivierten Proteinkinase C-Isozyme vermittelt.

Unter „Proteinkinase C- α “ wird ein Protein verstanden, das durch Calciumionen und Dialcylglycerin aktiviert wird, wobei sich die aktivierte Proteinkinase C- α insbesondere im endoplasmatischen Retikulum und am Zellrand anreichert. Die Aminosäuresequenz der PKC- α und die die PKC- α -codierende Nucleinsäuresequenz sind in Coussens et al., Sciences, 233 (1986), 859-866, beschrieben. Das PKC- α -Protein weist eine ähnliche Domänenstruktur wie die übrigen cPKC-Proteine auf. Das Protein umfasst eine Pseudosubstrat-Domäne, eine Cystein-reiche Region, ei-

ne Calcium-Bindungsdomäne und eine katalytische Domäne auf. PKC- α kann durch Diacylglycerin, Phorbol ester, Phosphatditylserin und Calcium aktiviert werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Agenzien, die die Expression der Proteinkinase C- α vermindern oder hemmen“ solche Mittel verstanden, die sowohl unter in vitro-Bedingungen als auch unter in vivo-Bedingungen die Synthese eines funktionsfähigen PKC- α -Proteins vollständig verhindern oder zumindest reduzieren, wobei die Transkription der die PKC- α -codierenden DNA-Sequenz in eine komplementäre mRNA-Sequenz, die Prozessierung der mRNA, die Übersetzung der mRNA in eine Polypeptid-Kette, die Prozessierung des Polypeptids und/oder postranslationale Modifikationen des Polypeptids gehemmt oder vermindert werden. Die Verwendung von Agenzien, die die Expression der Proteinkinase C- α vermindern oder hemmen, kann also dazu führen, dass entweder überhaupt kein funktionsfähiges, beispielsweise aktivierbares PKC- α -Protein hergestellt wird oder aber die Menge des erzeugten funktionsfähigen, beispielsweise aktivierbaren PKC- α -Proteins vermindert ist. Die Verwendung von Agenzien, die die Expression der Proteinkinase C- α vermindern oder hemmen, kann aber auch dazu führen, dass ein nicht-funktionsfähiges, beispielsweise nicht-aktivierbares PKC- α -Protein oder ein nur teilweise funktionsfähiges PKC- α -Protein erzeugt wird.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Agenzien, die die Aktivität der Proteinkinase C- α vermindern oder hemmen“ solche Mittel verstanden, die sowohl unter in vitro-Bedingungen als auch unter in vivo-Bedingungen die biologische Aktivität des funktionsfähigen PKC- α -Proteins vollständig oder teilweise eliminieren können. Die vollständige oder teilweise Inaktivierung des PKC- α -Proteins kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass das verwendete Agens direkt mit dem PKC- α -Protein in Wechselwirkung tritt. Die direkte Interaktion zwischen Agens und PKC- α -Protein kann beispielsweise durch kovalente oder nicht-kovalente Bindung erfolgen. Durch die Wechselwirkung zwischen Agens und PKC- α -Protein kann es beispielsweise auch zu chemischen Änderungen der Proteinkinase kommen, die zu einem Verlust der biologischen Aktivität der Proteinkinase führt. Die Wechselwirkung kann bei-

spielsweise auch zu einem spezifischen Abbau der PKC- α führen. Agenzien, die die Aktivität der Proteinkinase C- α vermindern oder hemmen, können aber auch solche sein, die spezifische Substrate, Zielstrukturen oder Zielmoleküle der PKC- α so modifizieren oder eliminieren oder
5 daran binden, dass auf diese Weise die biologische Aktivität der PKC- α reduziert oder gänzlich unterbunden wird. Agenzien, die die Aktivität der Proteinkinase C- α vermindern oder hemmen, können auch solche sein, die die Translokation der PKC- α nach Aktivierung, beispielsweise durch Phorbol-Behandlung, in das endoplasmatische Retikulum oder an den Rand
10 der Zelle, verhindern, so dass die PKC- α nicht mit ihren spezifischen Substraten, Zielstrukturen oder Zielmolekülen in Wechselwirkung treten kann.

In besonders bevorzugter Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäß eingesetzten Agenzien um Agenzien, die speziell
15 fisch die Expression und/oder Aktivität der PKC- α vermindern oder hemmen, nicht jedoch die Expression und/oder Aktivität anderer PKC-Isoformen, beispielsweise der PKC- β .

Erfindungsgemäß sind die Agenzien, die spezifisch die Expression und/oder Aktivität der PKC- α vermindern oder hemmen, ausgewählt aus
20 der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- α -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- α hemmende oder vermindernde Substanzen, die Translokation der Proteinkinase C- α hemmende Substanzen, Antagonisten
25 der Proteinkinase C- α -Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- α -Aktivität.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist die verwendete Nucleinsäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 30 a) einer humane Proteinkinase C- α codierenden Nucleinsäure oder einem Fragment davon,
- b) einer Nucleinsäure, die zu der Nucleinsäure nach a) komplementär ist, oder einem Fragment davon,

c) einer Nucleinsäure, die durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen einer Nucleinsäure nach a) oder b) erhältlich ist, oder einem Fragment davon; und

d) einer Nucleinsäure, die zu einer Nuclein-säure nach a) bis c) eine Homologie von mehr als 80% aufweist oder einem Fragment davon.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer "Proteinkinase C- α oder ein Fragment davon codierenden Nucleinsäure" eine Nucleinsäure verstanden, die ein PKC- α -Protein oder ein Fragment davon codiert, das die funktionellen Domänen, insbesondere die Pseudosubstrat-Domäne, die Cystein-reiche Region, die Calcium-Bindungsdomäne und eine katalytische Domäne der nativen Proteinkinase C- α aufweist. In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung codiert die erfindungsgemäß verwendete Nucleinsäure humane PKC-alpha beziehungsweise Teile davon.

"Homologie" bedeutet im Zusammenhang mit der Erfindung eine Sequenzidentität von mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 85 % und besonders bevorzugt mindestens mehr als 90 %, 95 %, 97 % und 99 %. Der dem Fachmann bekannte Ausdruck der "Homologie" bezeichnet somit den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehreren Nucleinsäuremolekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird.

Bei der erfindungsgemäß verwendeten Nucleinsäure kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sequenz, insbesondere in linearer Form, handeln. Die Nucleinsäure kann eine aus natürlichen Quellen, beispielsweise aus eukaryontischen Geweben, vorzugsweise aus Säugergeweben, bevorzugter aus menschlichen Geweben, isolierte Nucleinsäure sein oder synthetisch hergestellt worden sein.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass die als Agens verwendete Nucleinsäure, sofern sie in einem Vektor, insbesondere einem Expressionsvektor, inseriert ist, in einer Wirtszelle in Antisense-Orientierung zu einem Promotor die Expression des Gens der humanen Proteinkinase C- α hemmen kann. Bei Insertion der erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäure in Antisense-Orientierung in einem Vektor, das

heißt bei Vorliegen eines Antisense-Konstrukts der erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäure, wird die Nucleinsäure als Antisense-Nucleinsäure transkribiert. Bei Transkription des nativen PKC-alpha-Gens der Zelle kann dann das erzeugte Antisense-Transkript der erfindungsgemäß verwendeten Nucleinsäure durch Watson-Crick-Basenpaarungen an das in Sense-Orientierung vorliegende mRNA-Transkript des nativen Proteinkinase C- α -Gens unter Bildung einer Duplex-Struktur binden. Auf diese Weise wird selektiv die Translation der mRNA des nativen PKC- α -Gens in ein Polypeptid unterbunden und die Expression der nativen PKC-alpha spezifisch gehemmt, ohne dass die Expression anderer zellulärer PKC-Isoformen gehemmt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die zur Erzeugung von Antisense-Konstrukten verwendete Nucleinsäure nicht die gesamte PKC-alpha-codierende Sequenz umfasst, sondern nur Fragmente davon. Diese Fragmente umfassen mindestens 10 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 50 Nucleotide, besonders bevorzugt mindestens 200 Nucleotide, wobei die von den Fragmenten überspannten Nucleotid-Bereiche der PKC-alpha-codierenden Sequenz so ausgewählt sind, dass bei Expression der Fragmente in Antisense-Orientierung in einer Zelle eine spezifische Hemmung der Expression der PKC-alpha, insbesondere der humanen PKC-alpha, erfolgt, nicht jedoch eine Hemmung anderer PKC-Isoformen, beispielsweise der PKC-beta-Isoformen.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die vorstehend genannte Nucleinsäure beziehungsweise ein geeignetes Fragment davon in einem Vektor unter der Kontrolle von mindestens einem Expressions-Regulationselement insertiert ist, wobei die Nucleinsäure oder das Fragment davon in Antisense-Orientierung zu den Expressions-Regulations-elementen insertiert ist. Nach Einführung des Vektors in eine Zelle, beispielsweise eine Säugerzelle, insbesondere eine menschliche Zelle, kann so die Nucleinsäure oder das Fragment davon in Antisense-Orientierung exprimiert und dadurch die Expression der nativen PKC-alpha der Zelle effizient inhibieren. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vektor um ein Plasmid, ein Cosmid, einen Bakteriophagen oder ein Virus.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch einen Vektor, der eine PKC-alpha-codierende Nucleinsäuresequenz oder ein Fragment unter der funktionellen Kontrolle von mindestens einem Expression-Regulationselement umfasst, wobei die Nucleinsäure oder das Fragment davon in Antisense-Orientierung zu dem Regulationselement insertiert ist. Bei dem Expressions-Regulationselement handelt es sich insbesondere um einen Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle, eine Signalsequenz oder einen 3'-Transkriptionsterminator.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Wirtszelle, die einen vorstehend beschriebenen Vektor enthält. Bei der Wirtszelle handelt es sich insbesondere um eine Säugerzelle, vorzugsweise eine menschliche Zelle. In besonders bevorzugter Form handelt es sich bei der menschlichen Zelle um eine adulte Stammzelle.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden zur Hemmung der Expression der PKC-alpha synthetisch hergestellte Antisense-Oligonucleotide eingesetzt, die mindestens 10 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 50 Nucleotide, besonders bevorzugt mindestens 200 Nucleotide umfasst. Solche Antisense-Oligonucleotide können direkt zur Hemmung der PKC-alpha-Expression eingesetzt werden, das heißt müssen nicht in einen Vektor insertiert und unter zellulären Bedingungen exprimiert werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei diesen PKC- α -spezifischen Antisense-Oligonucleotiden um das Produkt ISIS 3521 von Isis Pharmaceuticals, das ein starker selektiver Inhibitor der Proteinkinase-alpha-Expression ist. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäß eingesetzten PKC- α -spezifischen Antisense-Oligonucleotiden um die von Busutti et al., J. Surg. Pathol., 63 (1996), 137-142, beschriebenen Antisense-Oligodesoxynucleotide.

Erfindungsgemäß können sowohl die vorstehend genannten Nucleinsäuren, die diese Nucleinsäuren enthaltenden Vektoren als auch die Vektoren enthaltende Wirtszellen als Agenzien zur Behandlung und/oder Prävention von Gefäß-Krankheiten, Herz-Kreislauf-Krankheiten, mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen, mit Diabetes mellitus assoziierten Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen, mit Hypertonie

assoziierten kardiovaskuläre Komplikationen und/oder mit Hypercholesterinämie assoziierten kardiovaskulären Komplikationen, beispielsweise im Rahmen einer Gentherapie, eingesetzt werden.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass zur Hemmung oder Verminderung der Expression der Proteinkinase-alpha ein Aktivator der Proteinkinase C- α eingesetzt wird. Vorzugsweise ist der Aktivator eine Phorbol-Verbindung, insbesondere 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) oder Phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu). Es ist bekannt, dass eine Inkubation von Zellen mit beispielsweise
10 weise PDBu über einen Zeitraum von 16 h bis 24 h zu einer vollständigen Down-Regulation der PKC-alpha führt (Busutti et al., J. Surg. Res., 63 (1996), 137-142). Auch ist bekannt, dass eine Behandlung mit einer höheren TPA-Konzentration, beispielsweise 1,6 μ M, die PKC-alpha-Expression vollständig hemmt. Erfindungsgemäß ist daher die Be-
15 handlung erkrankter Gewebe mit Phorbolestern in einer Konzentration von vorzugsweise mehr als 1,6 μ M über einen Zeitraum von mindestens 15 h vorgesehen, um die Expression der PKC-alpha in den betreffenden Geweben oder Organen zu teilweise oder vollständig zu blockieren.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Verwendung eines Inhibitors zur Hemmung oder Verminderung der Aktivität der Proteinkinase- α vorgesehen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „Inhibitor“ ein Stoff verstanden, der die biologische Aktivität der Proteinkinase C- α kompetitiv hemmt, die Raumstruktur der PKC- α allosterisch verändert oder die PKC- α durch Substrathemmung in-
25 hibiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Inhibitor ein mit der Proteinkinase C- α spezifisch reagierender Antikörper. Unter einem „Antikörper“ werden Polypeptide verstanden, die im Wesentlichen durch ein Immunglobulin-Gen beziehungsweise Immunglobulin-Gene
30 codiert werden, oder Fragmente davon, die spezifisch einen Analyten, das heißt ein Antigen, binden und erkennen können. Durch die Bindung des Antikörpers an die PKC- α wird deren biologische Aktivität gehemmt. Erfindungsgemäß können die Antikörper gegen die Proteinkinase C- α als intakte Immunglobuline oder als eine Reihe von Fragmenten vorkommen,

die durch Spaltung mit verschiedenen Peptidasen erzeugt werden. Der erfindungsgemäß verwendete Begriff "Antikörper" betrifft auch modifizierte Antikörper, zum Beispiel oligomere Antikörper, reduzierte Antikörper, oxidierte Antikörper und markierte Antikörper. Der Begriff "Antikörper" umfasst auch Antikörperfragmente, die entweder durch Modifizierung des gesamten Antikörpers oder de novo unter Verwendung von DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt wurden. Der Begriff "Antikörper" umfasst daher sowohl intakte Moleküle als auch Fragmente davon, wie Fab, F(ab')₂ und Fv, die an die epitopischen Determinanten binden können. Diese Antikörperfragmente behalten die Fähigkeit, selektiv an das entsprechende Antigen zu binden. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern beziehungsweise von Fragmenten davon sind im Stand der Technik bekannt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der erfindungsgemäß zur Hemmung der Aktivität der Proteinkinase C- α verwendete Antikörper ein monoklonaler oder polyclonaler Antikörper. Erfindungsgemäß kann der Antikörper auch ein humanisierter Antikörper ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die zur Hemmung der Aktivität der Proteinkinase C- α verwendeten Antikörper die von Goodnight et al., J. Biol. Chem., 270 (1995), 9991-10001, beschrieben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der anmeldungsgemäß zur Hemmung der PKC-alpha eingesetzte Inhibitor den Phosphorylierungsstatus von Proteinkinase C- α ändert und dadurch die Aktivität der PKC-alpha hemmt oder zumindest vermindert. Aus Tasinato et al., Biochem. J., 334 (1998), 243-249, ist bekannt, dass alpha-Tocopherol die zelluläre Proteinkinase C-alpha inaktivieren kann, indem der Phosphorylierungsstatus von PKC-alpha verändert wird. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist daher die Verwendung von alpha-Tocopherol zur Hemmung der Aktivität der PKC-alpha und daher zur Behandlung und/oder Prävention von Gefäßkrankheiten, Herz-Kreislauf-Krankheiten, mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären

Komplikationen bei Patienten mit Hypotonie und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie vorgesehen.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Antagonisten der PKC-alpha zur Behandlung und/oder Prävention von Gefäß-Krankheiten, Herz-Kreislauf-Krankheiten, mit Protei-
nurie assoziierten Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypotonie und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercho-
10 lesterinämie vorgesehen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „Antagonisten“ ein Stoff verstanden, der mit der PKC-alpha um Bindung an ein PKC-alpha-spezifisches Substrat konkurriert, ohne jedoch nach Bindung an das Substrat die gleiche Wirkung wie die PKC-alpha hervorzurufen. Unter Antagonisten werden auch Sub-
15 stanzen verstanden, die aufgrund ihrer Struktur an eine inaktive Konformation eines PKC-alpha-spezifischen Substrates angepasst sind und daher die Aktivierung des Substrates durch die PKC-alpha verhindern.

In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung wird als Antagonist zur Hemmung der PKC-alpha-Aktivität ein Derivat der PKC-alpha eingesetzt,
20 das zwar an die Substrate der nativen PKC-alpha binden kann, nach Bindung daran allerdings nicht die gleiche biologische Wirkung wie native PKC-alpha entfalten kann.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter "Deriva-
ten" funktionelle Äquivalente oder Abkömmlinge der Proteinkinase C- α
25 verstanden, die unter Beibehaltung der PKC- α -Grundstruktur durch Substitution von Atomen oder Molekülgruppen beziehungsweise -resten erhalten werden und/oder deren Aminosäuresequenzen sich von der natürlicherweise vorkommender menschlicher oder tierischer PKC- α -Moleküle an mindestens einer Position unterscheiden, die aber im wesentlichen ei-
30 nen hohen Grad an Homologie auf der Aminosäureebene aufweisen. Erfindungsgemäß umfasst der Begriff "Derivat" auch Fusionsproteine, bei denen am N-terminalen Teil beziehungsweise am C-terminalen Teil funktionelle Domänen eines anderen Proteins, beispielsweise eines anderen PKC- α -Inhibitors, vorhanden sind.

Die Unterschiede zwischen einem Derivat und nativer PKC- α können beispielsweise durch Mutationen, wie zum Beispiel Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Anlagerungen, Basenaustausche und/oder Rekombinationen der die PKC- α -Aminosäuresequenzen codierenden Nucleotidsequenzen entstanden sein. Selbstverständlich kann es sich dabei auch um natürlicherweise auftretende Sequenzvariationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus einem anderen Organismus oder um Sequenzen, die auf natürliche Weise mutiert wurden, oder Mutationen, die mit Hilfe üblicher, auf dem Fachgebiet bekannter Mittel, beispielsweise chemische Agenzien und/oder physikalische Agenzien, gezielt in die entsprechenden Sequenzen eingeführt wurden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird als Antagonist zur Hemmung der PKC-alpha-Aktivität ein Analog der PKC-alpha eingesetzt. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Analoga“ von Proteinkinase C Verbindungen verstanden, die keine mit der Proteinkinase C- α identische Aminosäuresequenz aufweisen, deren dreidimensionale Struktur jedoch der der Proteinkinase C- α stark ähnelt. Die erfindungsgemäß eingesetzten Analog der PKC- α weisen vorzugsweise ähnliche Substratspezifitäts-Eigenschaften wie die PKC- α auf, das heißt können an die PKC-alpha-spezifischen Substrate binden, besitzen vorzugsweise jedoch nicht die katalytischen Eigenschaften der PKC- α . Bei den erfindungsgemäß eingesetzten Proteinkinase C- α -Analoga kann es sich daher beispielsweise um Verbindungen handeln, die die für die Bindung von Proteinkinase C- α an PKC- α -Substrate verantwortlichen Aminosäurereste in geeigneter Konformation enthalten und die daher die essentiellen Eigenschaften des Bindungsbereiches der Proteinkinase C- α nachahmen können, ohne jedoch die gleichen katalytischen Eigenschaften wie die Proteinkinase C- α zu besitzen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, das zur Behandlung und/oder Prävention von Gefäß-Krankheiten, Herz-Kreislauf-Krankheiten, mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypertonie und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie Agenzien eingesetzt werden, die

nicht nur die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) vermindern oder hemmen, sondern gleichzeitig die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β (PKC- β). Takahashi und Kamimura beschreiben in J. Invest. Dermatol., 117 (2001), 605-611, dass das Immunsuppressivum Cyclosporin A die Expression der Proteinkinase-C-Isoformen alpha, beta I und beta II gleichzeitig vermindert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist daher die Verwendung von Cyclosporin A zur Verminderung der Expression der PKC-alpha und der PKC-beta und somit zur Behandlung der vorstehend genannten Krankheiten vorgesehen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass das Agens, das spezifisch die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α vermindert oder hemmt, in Kombination mit einem Agens verwendet wird, das spezifisch die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β vermindert oder hemmt. Erfindungsgemäß werden unter „Proteinkinase C- β “ sowohl die Proteinkinase C- β I als auch die Spleißvariante β II verstanden.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass das die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β vermindern oder hemmende Agens ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- β -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- β hemmende oder vermindern Substanzen, die Translokation der Proteinkinase C- β hemmende Substanzen, Antagonisten der Proteinkinase C- β -Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- β -Aktivität.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die als Agens einzusetzende Nucleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) einer humane Proteinkinase C- β codierenden Nucleinsäure oder einem Fragment davon,
- b) einer Nucleinsäure, die zu der Nucleinsäure nach a) komplementär ist, oder einem Fragment davon,

c) einer Nucleinsäure, die durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen einer Nucleinsäure nach a) oder b) erhältlich ist, oder einem Fragment davon; und

5 d) einer Nucleinsäure, die zu einer Nuclein-säure nach a) bis c) eine Homologie von mehr als 80% aufweist oder einem Fragment davon.

In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung codiert die erfindungsgemäß verwendete Nucleinsäure humane PKC-alpha beziehungsweise Teile davon.

10 Bei der erfindungsgemäß verwendeten Nucleinsäure kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sequenz, insbesondere in linearer Form, handeln. Die Nucleinsäure kann eine aus natürlichen Quellen, beispielsweise aus eukaryontischen Geweben, vorzugsweise aus Säugergeweben, bevorzugter aus menschlichen Geweben, isolierte Nucleinsäure sein oder synthetisch
15 hergestellt worden sein.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass die als Agens verwendete Nucleinsäure, sofern sie in einem Vektor, insbesondere einem Expressionsvektor, insertiert ist, in einer Wirtszelle in Antisense-Orientierung zu einem Promotor die Expression des Gens der humanen
20 Proteinkinase C- β hemmen kann. Bei Insertion der erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäure in Antisense-Orientierung in einem Vektor, das heißt bei Vorliegen eines Antisense-Konstrukts der erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäure, wird die Nucleinsäure als Antisense-Nucleinsäure transkribiert. Bei Transkription des nativen PKC- β -Gens
25 der Zelle kann dann das erzeugte Antisense-Transkript der erfindungsgemäß verwendeten Nucleinsäure an das in Sense-Orientierung vorliegende mRNA-Transkript des nativen Proteinkinase C- β -Gens unter Bildung einer Duplex-Struktur binden. Auf diese Weise wird selektiv die
30 Translation der mRNA des nativen PKC- β -Gens in ein Polypeptid unterbunden und die Expression der nativen PKC- β spezifisch gehemmt, ohne dass die Expression anderer zellulärer PKC-Isoformen gehemmt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die zur Erzeugung von Antisense-Konstrukten verwendete Nuclein-

säure nicht die gesamte PKC- β -codierende Sequenz umfasst, sondern nur Fragmente davon. Diese Fragmente umfassen mindestens 10 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 50 Nucleotide, besonders bevorzugt mindestens 200 Nucleotide, wobei die von den Fragmenten überspannten Nucleotid-Bereiche der PKC- β -codierenden Sequenz so ausgewählt sind, dass bei Expression der Fragmente in Antisense-Orientierung in einer Zelle eine spezifische Hemmung der Expression der PKC- β , insbesondere der humanen PKC- β , erfolgt, nicht jedoch eine Hemmung anderer PKC-Isoformen.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die vorstehend genannte Nucleinsäure beziehungsweise ein geeignetes Fragment davon in einem Vektor unter der Kontrolle von mindestens einem Expressions-Regulationselement insertiert ist, wobei die Nucleinsäure oder das Fragment davon in Antisense-Orientierung zu den Expressions-Regulationselementen insertiert ist. Nach Einführung des Vektors in eine Zelle, beispielsweise eine Säugerzelle, insbesondere eine menschliche Zelle, kann so die Nucleinsäure oder das Fragment davon in Antisense-Orientierung exprimiert und dadurch die Expression der nativen PKC- β der Zelle effizient inhibieren. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vektor um ein Plasmid, ein Cosmid, einen Bakteriophagen oder ein Virus.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch einen Vektor, der eine PKC- β -codierende Nucleinsäuresequenz oder ein Fragment unter der funktionellen Kontrolle von mindestens einem Expression-Regulationselement umfasst, wobei die Nucleinsäure oder das Fragment davon in Antisense-Orientierung zu dem Regulationselement insertiert ist. Bei dem Expressions-Regulationselement handelt es sich insbesondere um einen Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle, eine Signalsequenz oder einen 3'-Transkriptionsterminator.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Wirtszelle, die einen vorstehend beschriebenen Vektor enthält. Bei der Wirtszelle handelt es sich insbesondere um eine Säugerzelle, vorzugsweise eine menschliche Zelle. In besonders bevorzugter Form handelt es sich bei der menschlichen Zelle um eine adulte Stammzelle.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden zur Hemmung der Expression der PKC- β synthetisch hergestellte Antisense-Oligonucleotide eingesetzt, die mindestens 10 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 50 Nucleotide, besonders bevorzugt mindestens 200 Nucleotide umfasst. Solche Antisense-Oligonucleotide können direkt zur Hemmung der PKC- β -Expression eingesetzt werden, das heißt müssen nicht in einen Vektor insertiert und unter zellulären Bedingungen exprimiert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, zur Hemmung der Aktivität der Proteinkinase C- β einen mit der Proteinkinase C- β spezifisch reagierender Antikörper oder ein geeignetes Fragment davon einzusetzen. Erfindungsgemäß kann es sich bei dem Antikörper um einen monoclonalen oder polyclonalen Antikörper handeln. Der erfindungsgemäß eingesetzte Antikörper kann auch ein humanisierter Antikörper sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, zur Hemmung der Aktivität der Proteinkinase C- β eine Substanz einzusetzen, die den Phosphorylierungsstatus von Proteinkinase C- β ändert.

In weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, zur Hemmung der Aktivität der Proteinkinase C- β ein Derivat oder Analog von Proteinkinase C- β einzusetzen, die als Antagonisten der PKC- β wirken. Vorzugsweise handelt es sich bei den erfindungsgemäß eingesetzten Derivaten oder Analoga der PKC- β um Stoffe, die mit der nativen PKC- β um Bindung an PKC- β -spezifische Substrate konkurrieren, ohne jedoch nach Bindung an die Substrate die gleiche Wirkung wie die PKC- β hervorzurufen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden zur spezifischen Hemmung oder Verminderung der Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β die in den Dokumenten US 5,491,242, US 5,661,173, US 5,481,003, US 5,668,152, US 5,672,618, WO 95/17182, WO 95/35294 und WO 02/ beschriebenen Verbindungen eingesetzt.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung von Agenzien, die spezifisch die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) vermindern oder hemmen, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung und/oder Prävention von koronarer Herzerkrankung, Herzinfarkt, peripherer Verschlusskrankheit, Schlaganfall, mit Proteinurie einhergehenden Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypertonus und kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie. Erfindungsgemäß handelt es sich bei den kardiovaskulären Komplikationen vorzugsweise um koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt, periphere Verschlusskrankheit und Schlaganfall. Bei den diabetischen Spätschäden handelt es sich insbesondere um diabetische Retinopathie, diabetische Neuropathie und diabetische Nephropathie.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „pharmazeutischen Zusammensetzung“ oder einem „Arzneimittel“ ein zu diagnostischen, therapeutischen und/oder prophylaktischen Zwecken verwendetes, also ein die Gesundheit eines menschlichen oder tierischen Körpers förderndes oder wiederherstellendes Gemisch verstanden, das mindestens einen natürlichen oder synthetisch hergestellten Wirkstoff umfasst, der die therapeutische Wirkung hervorruft. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann sowohl ein festes als auch ein flüssiges Gemisch sein. Beispielsweise kann eine den Wirkstoff umfassende pharmazeutische Zusammensetzung einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche Komponenten enthalten. Darüber hinaus kann die pharmazeutische Zusammensetzung üblicherweise auf dem Fachgebiet verwendete Zusatzstoffe, beispielsweise Stabilisatoren, Fertigungsmittel, Trennmittel, Sprengmittel, Emulgatoren oder andere üblicherweise zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzung verwendete Stoffe umfassen.

Erfindungsgemäß ist insbesondere die Verwendung von Agenzien, die spezifisch die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) vermindern oder hemmen, als Wirkstoff zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie und/oder Prophylaxe der vorstehend genannten Krankheiten vorgesehen. In bevorzugter Ausführungsform der Erfin-

5 dung sind die zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen eingesetzten Agenzien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- α -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- α hemmende oder vermindernde Substanzen, die Translokation der Proteinkinase C- α hemmende Substanzen, Antagonisten der Proteinkinase C- α -Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- α -Aktivität.

10 Besonders bevorzugt handelt es sich bei den zur Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung verwendeten Agenzien um Antisense-Oligonucleotide des Proteinkinase C- α -codierenden Gens, Tocopherol, Phorbol-Verbindungen, Derivate der Proteinkinase C- α oder Analoga der Proteinkinase C- α .

15 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen, insbesondere intravenösen, intramuskulären, intrakutanen oder subkutanen Verabreichung verwendet wird. Vorzugsweise weist das die erfindungsgemäß eingesetzten Agenzien enthaltende Arzneimittel die Form einer Injektion oder Infusion auf.

20 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die die erfindungsgemäß eingesetzten Agenzien enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung oral verabreicht wird. Beispielsweise wird das Arzneimittel in einer flüssigen Darreichungsform wie einer Lösung, Suspension oder Emulsion, oder einer festen Darreichungsform wie einer
25 Tablette verabreicht.

30 Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch pharmazeutische Zusammensetzungen zur Prävention und/oder Behandlung von koronarer Herzerkrankung, Herzinfarkt, peripherer Verschlusskrankheit, Schlaganfall, mit Proteinurie einhergehenden Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypertonus und kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie, umfassend mindestens ein Agens, das die Expression

und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) spezifisch vermindert oder hemmt, als Wirkstoff.

In bevorzugter Ausführungsform sind die in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenen Agenzien ausgewählt aus der Gruppe bestehend
5 aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- α -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- α hemmende oder vermindernde Substanzen, die Translokation der Proteinkinase C- α hemmende Substanzen, Antagonisten der Proteinkinase C- α -
10 Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- α -Aktivität.

Besonders bevorzugt enthält die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung Antisense-Oligonucleotide des Proteinkinase C- α -codierenden Gens, Tocopherol, Phorbol-Verbindungen, Derivate der Proteinkinase C- α oder Analoga der Proteinkinase C- α .

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung mindestens einen weiteren Wirkstoff. Bei dem weiteren Wirkstoff handelt es sich insbesondere um ein Agens, das spezifisch die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β vermindert oder hemmt.

20 Vorzugsweise ist das die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β vermindernde oder hemmende Agens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- β -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- β hemmende oder vermindernde Substanzen, die Translokation der
25 Proteinkinase C- β hemmende Substanzen, Antagonisten der Proteinkinase C- β -Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- β -Aktivität.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

30 Die Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele näher erläutert.

Figur 1 zeigt die Albumin-Ausscheidung im Urin von PKC-alpha-„knock out“-Mäusen mit Diabetes mellitus und ohne Diabetes mellitus (Kontrolle) und SV129-Mäusen mit Diabetes und ohne Diabetes (Kontrolle). Dabei wurde die Albumin-Konzentration unter Verwendung eines indirekten ELISA-Tests bestimmt. Die ermittelten Albumin-Werte wurden auf die Kreatinin-Konzentration bezogen. Die nicht-diabetischen SV129- und PKC- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse weisen einen vergleichbaren Albumin/Kreatinin-Quotienten auf, der in der Regel unter 10 g/mol liegt. Hingegen liegt der Quotient bei diabetischen SV129-Mäusen signifikant höher ($p = 0,004$). Die Werte der diabetischen PKC- $\alpha^{-/-}$ -Mäuse sind signifikant niedriger als die Werte der diabetischen SV129-Mäuse ($P = < 0,001$). Der Querstrich zeigt den Median an. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet.

Figur 2 zeigt die glomeruläre VEGF-Expression bei PKC-alpha-„knock out“-Mäusen mit Diabetes mellitus und ohne Diabetes mellitus (Kontrolle) und SV129-Mäusen mit Diabetes und ohne Diabetes (Kontrolle). Dabei wurden pro Tiergruppe jeweils 40 Glomeruli unter Verwendung immunhistochemischer Verfahren semiquantitativ ausgewertet, wobei eine Unterteilung in eine schwache, mittlere und starke Immunfluoreszenz erfolgte. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die VEGF-Expression ist bei diabetischen Tieren signifikant höher als bei Kontrolltieren ($p < 0,001$). Jedoch ist die VEGF-Expression bei diabetischen SV129-Tieren signifikant höher als bei diabetischen PKC-alpha $^{-/-}$ -Tieren ($p < 0,001$).

Figur 3 zeigt die glomeruläre VEGF-Rezeptor-II-Expression bei PKC-alpha-„knock out“-Mäusen mit Diabetes mellitus und ohne Diabetes mellitus (Kontrolle) und SV129-Mäusen mit Diabetes und ohne Diabetes (Kontrolle). Dabei wurden pro Tiergruppe jeweils 40 Glomeruli unter Verwendung immunhistochemischer Verfahren semiquantitativ ausgewertet, wobei eine Unterteilung in eine schwache, mittlere und starke Immunfluoreszenz erfolgte. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die VEGFR-II-Expression ist bei diabetischen Tieren signifikant höher als bei Kontrolltieren ($p < 0,001$). Jedoch ist die VEGFR-II-Expression bei diabetischen SV129-Tieren signifikant höher als bei diabetischen PKC-alpha $^{-/-}$ -Tieren ($p < 0,001$).

Figur 4 zeigt die glomeruläre Perlecan-Expression bei PKC-alpha-„knock out“-Mäusen mit Diabetes mellitus und ohne Diabetes mellitus (Kontrolle) und SV129-Mäusen mit Diabetes und ohne Diabetes (Kontrolle). Dabei wurden pro Tiergruppe jeweils 40 Glomeruli unter Verwendung immun-

5 histochemischer Verfahren semiquantitativ ausgewertet, wobei eine Unterteilung in eine schwache, mittlere und starke Immunfluoreszenz erfolgte. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Perlecan-Expression ist bei diabetischen SV129-Tieren signifikant niedriger als bei SV129-Kontrolltieren ($p < 0,001$).

10 Beispiel 1

Experimentelle Diabetes-Erzeugung

Bei Mäusen, die unter standardisierten Bedingungen bei 22°C gehalten wurden und freien Zugang zu Futter und Wasser hatten, wurden nach Genehmigung durch die Tierschutzbehörde Niedersachsen folgende Versuche

15 durchgeführt.

Vor Beginn des Versuches wurde bei allen Tieren der Blutzuckerspiegel aus dem Serum bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Bei 16 SV129-Kontrollmäusen und 14 SV129-Proteinkinase C alpha-knock out (PKC- $\alpha^{-/-}$)-Mäusen wurde ein Diabetes durch Injektion von Streptozotizin induziert. Streptozotizin führt zu einer Zerstörung der Insulin produzierenden Inselzellen im Pankreas. Durch den resultierenden Insulinmangel kommt es zu dauerhaft erhöhten Blutzuckerspiegeln, d.h. Hyperglykämie, und damit zum Diabetes mellitus. Zur Erzeugung der Hyperglykämie wurden den Tieren an den Tagen 1 und 4 jeweils 125 mg

20 Streptozotizin/kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Das Streptozotizin wurde für diese Zwecke in einer 50 mM Na-Citrat Lösung mit einem pH-Wert von 4,5 gelöst. Zur Kontrolle wurde 7 SV129- und 6 PKC- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen nur das Lösungsmittel an den Tagen 1 und 4 intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurde den Mäusen alle 2 Tage ein Tropfen Blut aus dem Schwanz entnommen, um den Blutzucker zu kontrollieren.

25 Die Blutzuckermessung erfolgte mittels des Glucometer Elite®-Messgeräts von Bayer. Zur Bestimmung wurden Glucometer Elite Sensor®-Teststreifen verwendet.

30

Am 7-10 Tag waren die Tiere, denen Streptozotozin verabreicht worden war, diabetisch mit Blutzuckerwerten oberhalb von 350 mg/dl. Die Ausgangswerte vor Streptozotozin-Injektion lagen im Schnitt bei 200 mg/dl. Bei Tieren, die nur das Lösungsmittel erhalten hatten, kam es zu keinem Anstieg der Blutzuckerwerte und sie entwickelten keinen Diabetes mellitus. 10 Tage nach der ersten Injektion wurden die Tiere für weitere 8 Wochen beobachtet. Während dieser Zeit wurde der Blutzucker alle zwei Wochen kontrolliert, um sicher zu stellen, dass die diabetischen Tiere weiterhin diabetisch waren. Die Zuckerwerte schwankten bei den diabetischen Tieren während dieser Zeit im Mittel um 500-550 mg/dl und bei den nicht diabetischen Tieren, um 200 mg/dl.

Nach 8 Wochen wurden die Tiere mit dem Narkosemittel Avertin betäubt. In Narkose wurde anschließend aus dem Augenvenenplexus 400 µl Blut und aus der Blase durch Punktion mit einer 27 G Nadel der gesamte Blasensurin entnommen. Anschließend wurden die Nieren mit Ringer-Lactat Lösung über die Bauchaorta perfundiert und die Nieren entfernt. Die Tiere wurden sofort danach in Narkose getötet. Die Blutzuckerwerte wurden anschließend aus dem Serum bestimmt. Die Blutzuckerspiegel finden sich in Tabelle 1 wieder. Wie zu erkennen ist, weisen die diabetischen Tiere etwa 2,5-3-mal höhere Glukose-Werte als zu Beginn des Versuches und auch im Vergleich zu den nicht-diabetischen Kontrolltieren auf.

Tabelle 1

Serumglucose bei diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen vor Versuchsbeginn und am Versuchsende

	Serumglucose vor Versuchsbeginn (mg/dl)	Serumglucose am Versuchsende (mg/dl)
SV129 Kontrolle (n = 7)	205 +/- 40	223 +/- 43
SV129 diabetisch (n = 16)	192 +/- 36	505 +/- 80*
PKC- $\alpha^{-/-}$ Kontrolle (n = 6)	223 +/- 27	197 +/- 21
PKC- $\alpha^{-/-}$ diabetisch (n = 14)	225 +/- 31	589 +/- 98*

* p = < 0,001 im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren

Beispiel 2Bestimmung der Albumin-Konzentration

Die Entstehung einer Albuminurie bei Patienten mit Diabetes ist ein bekanntes Phänomen. Daher wurde die Albuminausscheidung im Urin von

5 PKC- α -„knock out“-Mäusen mit Diabetes mellitus und ohne Diabetes mellitus (Kontrolle) und SV129-Mäusen mit Diabetes und ohne Diabetes (Kontrolle) bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Albuminkonzentration im gesammelten Urin bestimmt. Zur Bestimmung der Albuminkonzentration wurde ein indirekter ELISA-Test (Albuwell M®) der Firma Exocell Inc.,

10 Philadelphia, USA) verwendet. Dieser ELISA-Test ist für Mausalbumin spezifisch. Die Bestimmung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Um Schwankungen in der Urinausscheidung erfassen zu können, wurden die bestimmten Albuminwerte auf die Kreatininkonzentration im Urin bezogen. Die Ergebnisse sind in Figur 1 dargestellt. Dabei zeigte

15 sich, dass die nicht-diabetischen SV129- und PKC- α ^{-/-}-Mäuse einen vergleichbaren Albumin/Kreatinin-Quotienten haben, der in der Regel unter 10 g/mol liegt. Hingegen liegt der Quotient bei diabetischen SV129-Mäusen signifikant höher ($p = 0,004$). Der Median beträgt 21,5 g/mol versus 7,48 g/mol bei nicht-diabetischen SV129-Kontrolltieren. Im Ver-

20 gleich dazu kommt es bei diabetischen PKC- α ^{-/-}-Mäusen zu keinem signifikanten Anstieg der Albuminurie. Der Albumin/Kreatinin-Quotient liegt immer unter 20 g/mol und der Median findet sich bei 10,2 g/mol. Der Median der nicht-diabetischen PKC- α ^{-/-}-Kontrollmäuse liegt bei 8,5 g/mol. Die Werte der diabetischen PKC- α ^{-/-}-Mäuse sind signifikant nied-

25 riger als die Werte der diabetischen SV129-Mäuse ($P = < 0,001$). Die Ergebnisse sind in Figur 1 dargestellt.

Beispiel 3Bestimmung der VEGF- und VEGF-Rezeptor-II-Expression

Wie vorstehend in Beispiel 1 ausgeführt, wurden alle Tiere bei Beendi-

30 gung des Versuches getötet. Unmittelbar danach wurden die Nieren entnommen und bei -70°C eingefroren. Eine weitere Analyse der entnommenen Nieren zeigte in den Nierenkörperchen (Glomeruli) der diabetischen Kontrolltieren eine signifikante Zunahme der Expression des „vascular

endothelial growth factor" (VEGF) und des VEGF-Rezeptors II (VEGFR-II). Der Nachweis der VEGF- und VEGFR-II-Expression erfolgte mittels immunhistochemischer Verfahren. Dazu wurden die bei -70°C eingefrorenen Nieren mit einer Dicke von 6 nm kryo-geschnitten und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Gefrierschnitte mit kaltem Aceton fixiert, luftgetrocknet und mit Tris-Puffer (TBS: 0.05M Tris-Puffer, 0,15 M NaCl, pH 7.6) gewaschen. Die Gefrierschnitte wurden anschließend 60 Minuten in einer feuchten Kammer mit einem primären polyklonalen „rabbit“ Antikörper gegen Maus-VEGF (Santa Cruz, A-20) bzw. VEGFR-II (Santa Cruz, C-1158) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS wurden die Schnitte mit einem Cy3 markierten sekundären „anti-rabbit“ Antikörper (Jackson Immunresearch Laboratories, 711-165-152) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate durch ein Zeiss Axioplan-2 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet und photographiert. Bei allen Tieren wurden jeweils 40 Nierenkörperchen ausgewertet, wobei die Fluoreszenz-Intensität in stark, mittel und schwach unterteilt wurde. Dabei fand sich bei diabetischen SV129 Kontrolltieren eine signifikante Zunahme ($p < 0,001$) der VEGF- und VEGF-R-II-Expression gegenüber nicht-diabetischen Kontrolltieren. Im Vergleich dazu war die Zunahme der Expression signifikant weniger ausgeprägt bei diabetischen SV129- und PKC- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen ($p < 0,001$). Die Ergebnisse sind in den Figuren 2 und 3 gezeigt.

Beispiel 4

25 Bestimmung der Perlecan-Expression

Da die festgestellte unterschiedliche VEGF-Expression allein nicht den Unterschied in der Albuminurie erklären konnte, wurde die Expression des Heparansulfat-Proteoglycans Perlecan in den Nieren diabetischer und nicht-diabetischer Tiere unter Verwendung immunhistochemischer Verfahren untersucht. Dabei wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben, Kryoschnitte der Nieren angefertigt und eingebettet. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler Ratten-Antikörper der gegen Maus-Perlecan gerichtet ist verwendet (RDI Systems, A7L6). Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3 markierter „donkey anti-rat“ Antikörper

(Jackson Immunresearch Laboratories, 712-165-153) verwendet. Die immunhistochemische Untersuchung der Schnitte ergab völlig überraschend, dass Perlecan bei diabetischen Kontrolltieren nicht mehr oder, kaum noch nachweisbar war (vgl. Figur 4). So ließ sich weder im Glomerulus noch in der Gefäßwand von Arteriolen Perlecan nachweisen. Hingegen war die Expression von Perlecan bei SV129- und PKC- $\alpha^{-/-}$ -Mäusen unverändert oder nur geringfügig vermindert. Da das Fehlen von Heparansulfat als einer der Hauptmediatoren für die Entstehung einer Proteinurie gilt, ist davon auszugehen, dass dieser Befund das Ausbleiben einer Albuminurie erklären kann.

Ansprüche

1. Verwendung von Agenzien, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) vermindern oder hemmen, zur Behandlung und/oder Prävention von Gefäß-Krankheiten, Herz-Kreislauf-Krankheiten, mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypertonie und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Gefäß-Krankheiten und Herz-Kreislaufkrankheiten ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus peripherer Verschlusskrankheit, koronarer Herzerkrankung, Herzinfarkt und Schlaganfall.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die kardiovaskulären Komplikationen periphere Verschlusskrankheit, koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt und/oder Schlaganfall sind.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die diabetischen Spätschäden diabetische Retinopathie, diabetische Neuropathie und/oder diabetische Nephropathie sind.
5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen parenchymatöse Nierenerkrankungen sind.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Proteinurie glomeruläre Proteinurie, tubuläre Proteinurie oder glomerulär-tubuläre Mischproteinurie ist.
7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Nierenerkrankungen Minimal-change-Nephropathie, sonstige Glomerulopathien, Nierenamyloidose, hereditäre Tubulopathie, renal-tubuläre Azidose, medikamentös oder bakteriell induzierte interstitielle Nephritis, akutes Nierenversagen, Bence-Jones-Nephropathie oder Nierentransplantation sind.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Agenzien spezifisch die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) vermindern oder hemmen.

5 9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die Agenzien ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- α -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- α hemmende oder vermindern Substanzen, die Translokation der Proteinkinase C- α hemmende Substanzen, Antagonisten
10 der Proteinkinase C- α -Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- α -Aktivität.

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Nucleinsäure in einer Wirtszelle in Antisense-Orientierung zu einem Promoter die Expression des Gens der humanen Proteinkinase C- α hemmen kann.

15 11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Nucleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

a) einer humane Proteinkinase C- α codierenden Nucleinsäure oder einem Fragment davon,

20 b) einer Nucleinsäure, die zu der Nucleinsäure nach a) komplementär ist, oder einem Fragment davon,

c) einer Nucleinsäure, die durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen einer Nucleinsäure nach a) oder b) erhältlich ist, oder einem Fragment davon; und

25 d) einer Nucleinsäure, die zu einer Nucleinsäure nach a) bis c) eine Homologie von mehr als 80% aufweist oder einem Fragment davon.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei das Fragment der Nucleinsäure mindestens 10 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 50 Nucleotide, besonders bevorzugt mindestens 200 Nucleotide umfasst.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei die Nucleinsäure eine DNA oder RNA ist.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 13, wobei die Nucleinsäure oder das Fragment davon in einem Vektor unter der Kontrolle von
5 mindestens einem Expressions-Regulationselement in Antisense-Orientierung dazu insertiert ist.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei der Vektor ein Plasmid, Cosmid, Bakteriophage oder Virus ist.

16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei das Expressions-
10 Regulationselement ein Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle, eine Signalsequenz oder ein 3'-Transkriptionsterminator ist.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei der Vektor in einer Wirtszelle enthalten ist.

18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei die Wirtszelle eine Säugerzelle,
15 le, insbesondere eine menschliche Zelle ist.

19. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die die Expression der Proteinkinase C- α hemmende oder vermindernde Substanz ein Aktivator der Proteinkinase C- α ist.

20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei der Aktivator eine Phorbol-
20 Verbindung ist.

21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Phorbol-Verbindung 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) oder Phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) ist.

22. Verwendung nach Anspruch 9, wobei der Inhibitor ein mit der Proteinkinase C- α reagierender Antikörper ist.
25

23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei der Antikörper ein monoklonaler oder polyclonaler Antikörper ist.

24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23, wobei der Antikörper ein humanisierter Antikörper ist.

25. Verwendung nach Anspruch 9, wobei der Inhibitor den Phosphorylierungsstatus von Proteinkinase C- α ändert.

5 26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei der Inhibitor Tocopherol ist.

27. Verwendung nach Anspruch 9, wobei der Antagonist ein Derivat oder Analog von Proteinkinase C- α ist.

10 28. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Agens, das die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α vermindert oder hemmt, ein Agens ist, das gleichzeitig die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β vermindert oder hemmt.

29. Verwendung nach Anspruch 28, wobei das Agens Cyclosporin A ist.

15 30. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, wobei das Agens, das spezifisch die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α vermindert oder hemmt, in Kombination mit einem Agens, das spezifisch die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β vermindert oder hemmt, eingesetzt wird.

20 31. Verwendung nach Anspruch 30, wobei das die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β vermindern oder hemmende Agens ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- β -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- β hemmende oder vermindern Substanzen, die Translokation der Proteinkinase C- β hemmende Substanzen,
25 Antagonisten der Proteinkinase C- β -Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- β -Aktivität.

32. Verwendung nach Anspruch 31, wobei die Nucleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

a) einer humane Proteinkinase C- β codierenden Nucleinsäure oder einem Fragment davon,

b) einer Nucleinsäure, die zu der Nucleinsäure nach a) komplementär ist, oder einem Fragment davon,

5 c) einer Nucleinsäure, die durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen einer Nucleinsäure nach a) oder b) erhältlich ist, oder einem Fragment davon; und

d) einer Nucleinsäure, die zu einer Nucleinsäure nach a) bis c) eine Homologie von mehr als 80% aufweist oder einem Fragment davon.
10

33. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das Fragment der Nucleinsäure mindestens 10 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 50 Nucleotide, besonders bevorzugt mindestens 200 Nucleotide umfasst.

15 34. Verwendung nach einem der Ansprüche 31 bis 33, wobei die Nucleinsäure eine DNA oder RNA ist.

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 31 bis 34, wobei die Nucleinsäure oder das Fragment davon in einem Vektor unter der Kontrolle von mindestens einem Expressions-Regulationselement in Antisense-Orientierung dazu insertiert ist.

20 36. Verwendung nach Anspruch 35, wobei der Vektor ein Plasmid, Cosmid, Bakteriophage oder Virus ist.

37. Verwendung nach Anspruch 35 oder 36, wobei das Expressions-Regulationselement ein Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle, eine Signalsequenz oder ein 3'-Transkriptionsterminator ist.

25 38. Verwendung nach einem der Ansprüche 35 bis 37, wobei der Vektor in einer Wirtszelle enthalten ist.

39. Verwendung nach Anspruch 38, wobei die Wirtszelle eine Säugerzelle, insbesondere eine menschliche Zelle ist.

40. Verwendung nach Anspruch 31, wobei der Inhibitor ein mit der Proteinkinase C- β reagierender Antikörper ist.

41. Verwendung nach Anspruch 40, wobei der Antikörper ein monoklonaler oder polyclonaler Antikörper ist.

5 42. Verwendung nach Anspruch 40 oder 41, wobei der Antikörper ein humanisierter Antikörper ist.

43. Verwendung nach Anspruch 31, wobei der Inhibitor den Phosphorylierungsstatus von Proteinkinase C- β ändert.

10 44. Verwendung nach Anspruch 31, wobei der Antagonist ein Derivat oder Analog von Proteinkinase C- β ist.

45. Verwendung von Agenzien, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) vermindern oder hemmen, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung und/oder Prävention von koronarer Herzerkrankung, Herzinfarkt, peripherer Verschlusskrankheit, Schlaganfall, mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypertonus und kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie.

20 46. Verwendung nach Anspruch 45, wobei die kardiovaskulären Komplikationen koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt, periphere Verschlusskrankheit oder Schlaganfall sind.

25 47. Verwendung nach Anspruch 45, wobei die diabetischen Spätschäden diabetische Retinopathie, diabetische Neuropathie und diabetische Nephropathie sind.

48. Verwendung nach einem der Ansprüche 45 bis 47, wobei die Agenzien ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- α -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- α hemmende oder vermindernde

30

Substanzen, die Translokation der Proteinkinase C- α hemmende Substanzen, Antagonisten der Proteinkinase C- α -Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- α -Aktivität.

49. Verwendung nach Anspruch 48, wobei die Agenzien Antisense-Oligonucleotide des Proteinkinase C- α -codierenden Gens, Tocopherol, Phorbol-Verbindungen, Derivate der Proteinkinase C- α oder Analoga der Proteinkinase C- α sind.

50. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Prävention und/oder Behandlung von koronarer Herzerkrankung, Herzinfarkt, peripherer Verschlusskrankheit, Schlaganfall, mit Proteinurie einhergehenden Nierenerkrankungen, diabetischen Spätschäden und/oder kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus, kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypertonus und kardiovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Hypercholesterinämie, umfassend mindestens ein Agens, das die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- α (PKC- α) spezifisch vermindert oder hemmt, als Wirkstoff.

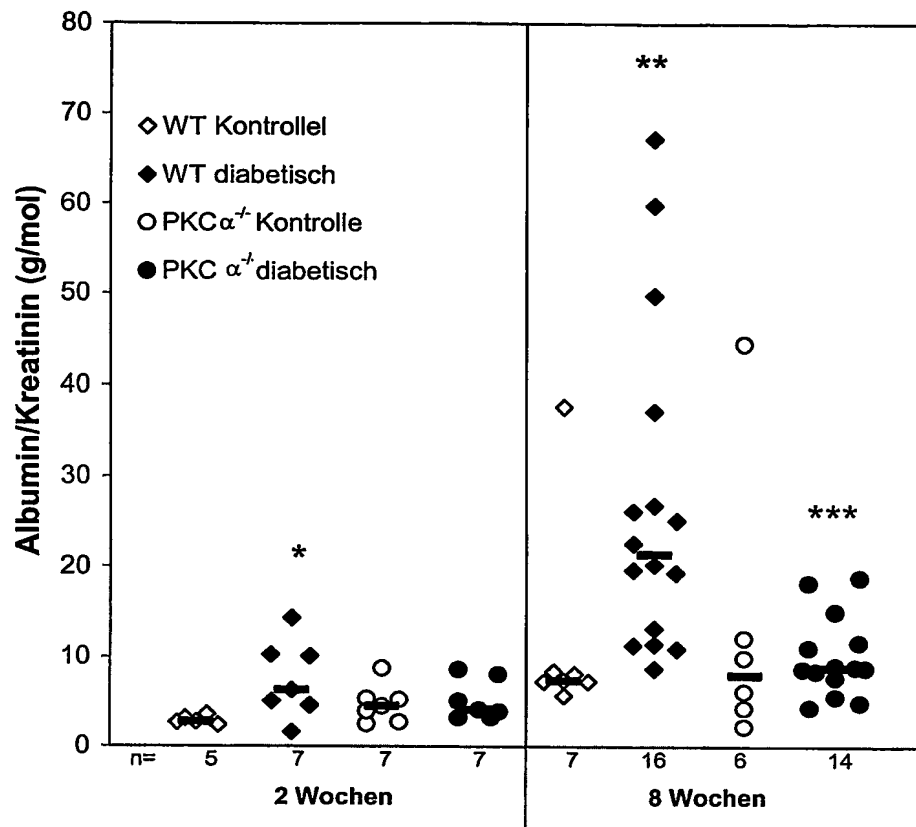
51. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 50, wobei die Agenzien ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- α -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- α hemmende oder vermindern-
de Substanzen, die Translokation der Proteinkinase C- α hemmende Substanzen, Antagonisten der Proteinkinase C- α -Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- α -Aktivität.

52. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 51, wobei die Agenzien Antisense-Oligonucleotide des Proteinkinase C- α -codierenden Gens, Tocopherol, Phorbol-Verbindungen, Derivate der Proteinkinase C- α oder Analoga der Proteinkinase C- α sind.

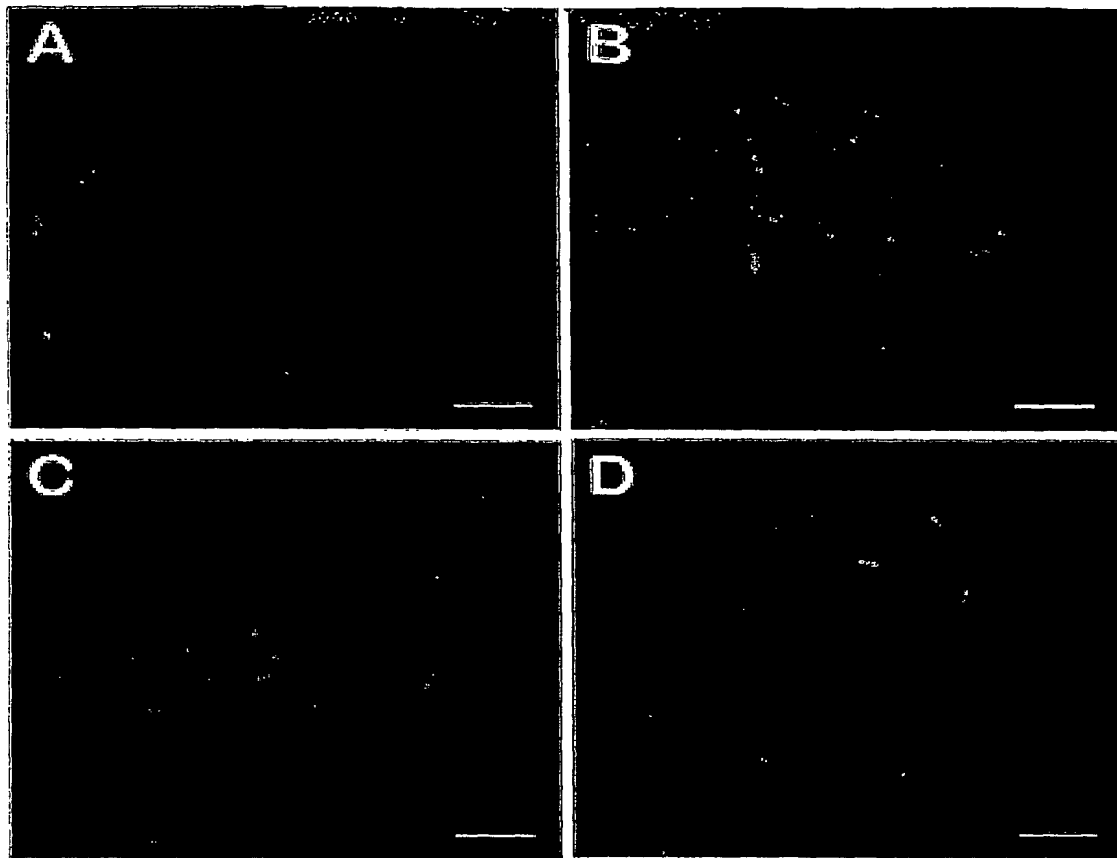
53. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 50 bis 52, umfassend mindestens einen weiteren Wirkstoff.

54. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 53, wobei der weitere Wirkstoff ein Agens ist, das spezifisch die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β vermindert oder hemmt.

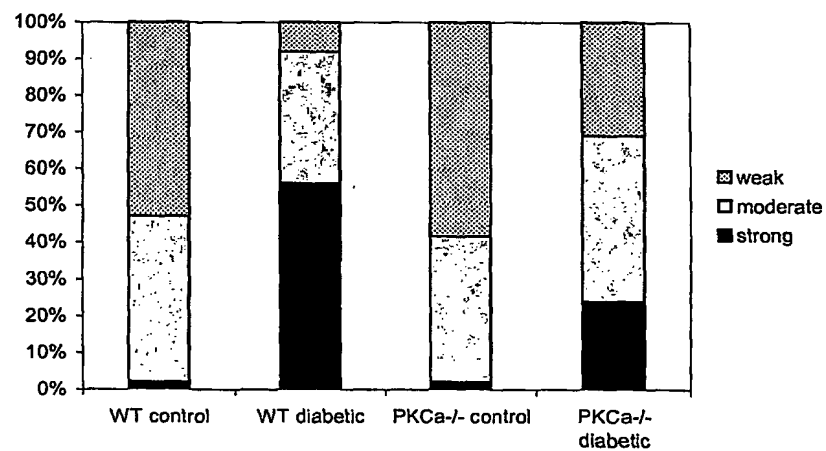
5 55. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 54, wobei das die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C- β vermindern oder hemmende Agens ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuren, die die Expression des Proteinkinase C- β -Gens vermindern oder hemmen, die Nucleinsäure enthaltenden Vektoren, die Vektoren enthaltenden Wirtszellen, die Expression der Proteinkinase C- β hemmende oder
10 vermindern Substanzen, die Translokation der Proteinkinase C- β hemmende Substanzen, Antagonisten der Proteinkinase C- β -Aktivität und Inhibitoren der Proteinkinase C- β -Aktivität.

**Abbildung 1:**

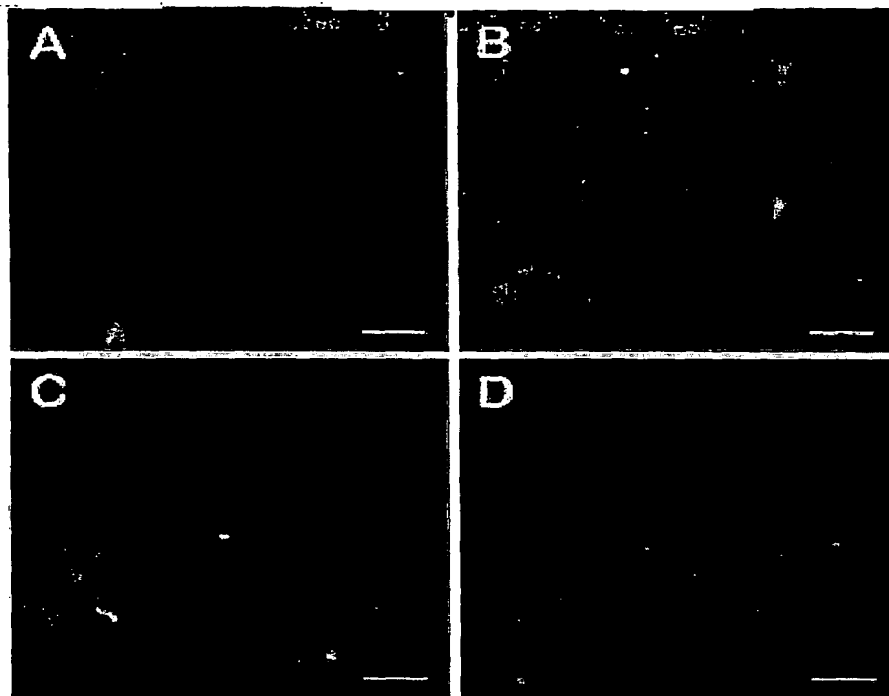
Albuminurie nach 2 und 8 Wochen Hyperglykämie. Der Medianwert ist als Balken markiert. *, $p < 0.05$ versus Kontrolle; **, $p < 0.01$ versus Kontrolle; ***, $p < 0.01$ versus SV129 diabetisch.



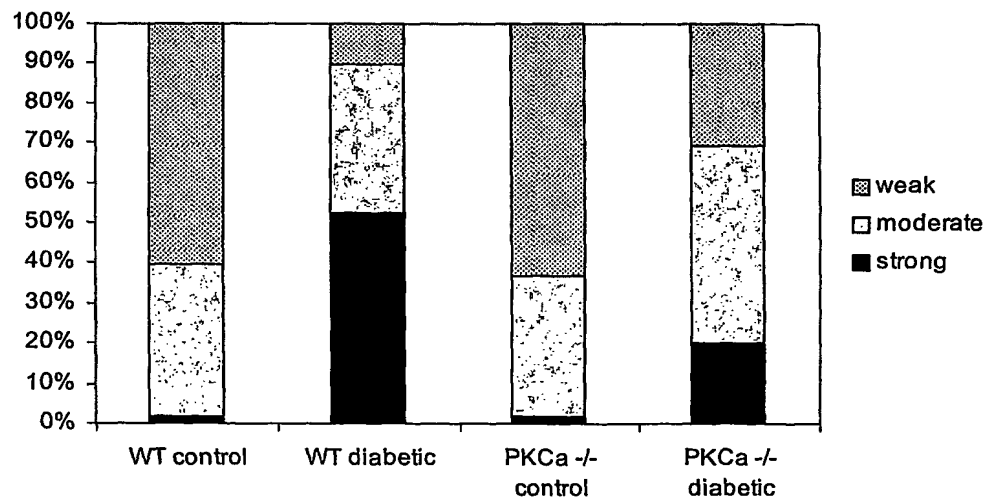
E

**Abbildung 2:**

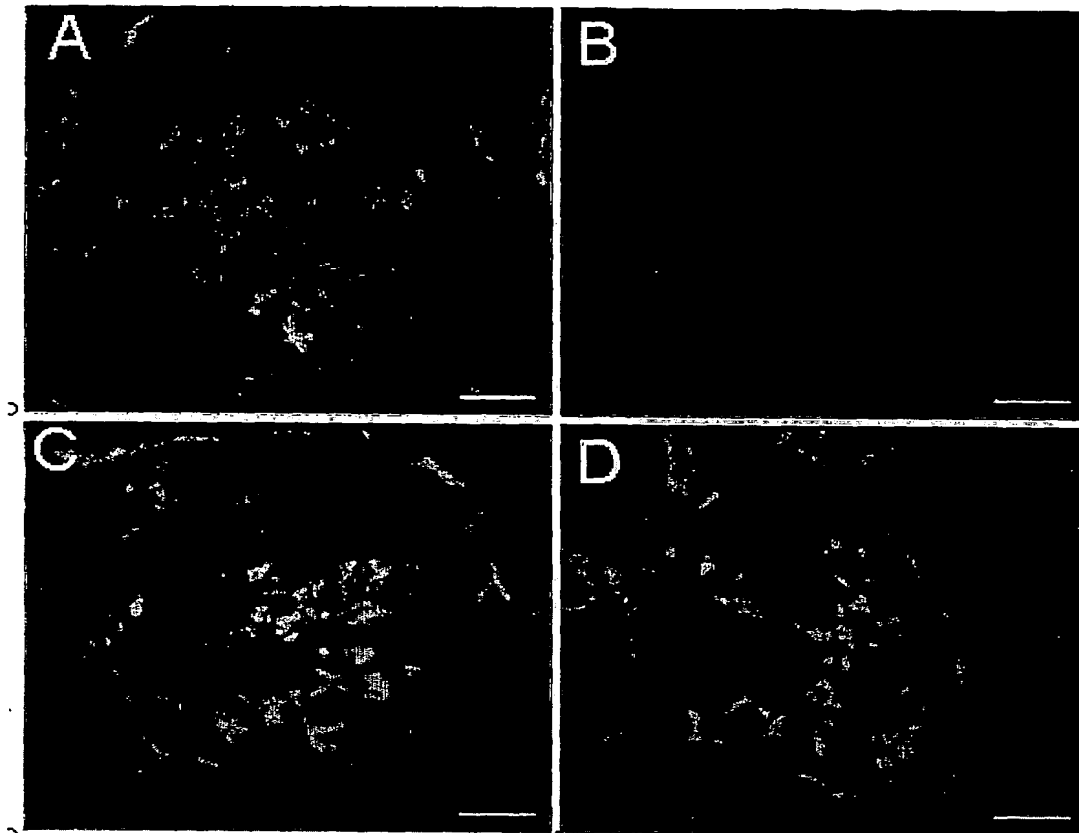
Repräsentative immunohistochemische Evaluation der VEGF Expression in Kontroll (A, B) und PKC $\alpha^{-/-}$ Mäusen (C, D) mit semiquantitativer Auswertung (E).



E

**Abbildung 3:**

Repräsentative immunohistochemische Evaluation der VEGF-RII Expression in Kontroll (A, B) und PKC α ^{-/-} Mäusen (C, D) mit semiquantitativer Auswertung.

**Abbildung 4:**

Die immunohistochemische Untersuchung der Schnitte ergab, dass das Heparansulfatproteoglycan bei diabetischen Kontrolltieren (B) nicht mehr oder kaum noch nachweisbar war, jedoch bei diabetischen PKC α ^{-/-} Mäusen (D) in normaler Konzentration gebildet wurde.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



10/528806



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. April 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/028516 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/7088,
38/45, 39/395, 31/235, 31/355, 38/13, A61P 5/48

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MENNÉ, Jan [DE/DE]; Phenomiques GmbH,
Feodor-Lynen-Str. 5, 30625 Hannover (DE). HALLER,
Hermann [DE/DE]; Medizinische Hochschule Hannover,
Carl-Neuberg Str. 1, 30625 Hannover (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003165

(22) Internationales Anmeldedatum:

23. September 2003 (23.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

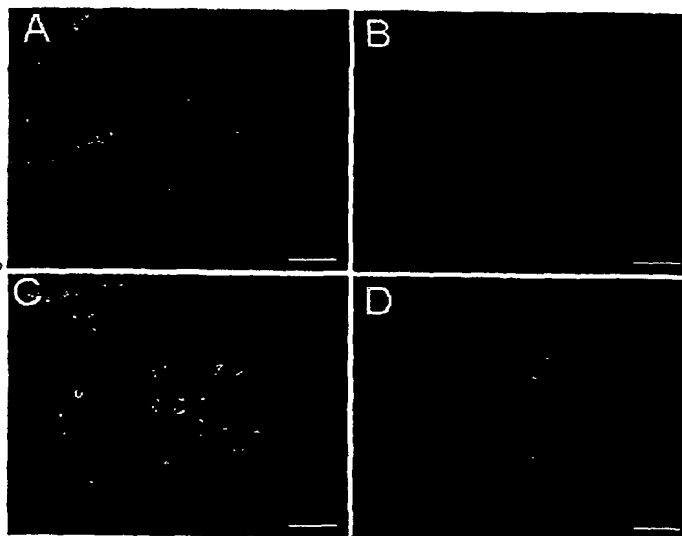
102 44 453.6 24. September 2002 (24.09.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: COMPOSITIONS FOR THE INHIBITION OF PROTEIN KINASE C ALPHA FOR TREATMENT OF DIABETES MELLITUS AND CARDIOVASCULAR DISEASES

(54) Bezeichnung: ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR HEMMUNG DER PROTEINKINASE C ALPHA ZUR BEHANDLUNG VON DIABETES MELLITUS UND KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to the use of agents impeding the expression and/or activity of protein kinase C alpha (PKC-), especially for treatment of patients with diabetes and complications such as diabetic nephropathy, retinopathy or neuropathy.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Agenzien, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C-alpha (PKC- α) insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Diabetes um Komplikationen wie eine diabetische Nephropathie, Retinopathie oder Neuropathie zu verhindern.

Die immunohistochemische Untersuchung der Schnitte ergab, dass das Heparansulfatproteoglycan bei diabetischen Kontrolltieren (B) nicht mehr oder kaum noch nachweisbar war, jedoch bei diabetischen PKC α ^{-/-} Mäusen (D) in normaler Konzentration gebildet wurde.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE SECTIONS INDICATED THAT
HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN COULD NO LONGER OR COULD
HARDLY BE DETECTED IN DIABETIC CONTROL ANIMALS (B) YET WAS
PRODUCED IN A NORMAL CONCENTRATION IN DIABETIC PKC α ^{-/-} MICE.

WO 2004/028516 A3



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

- *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle Bestimmungsstaaten*

Veröffentlicht:

- *mit internationalem Recherchenbericht*
- *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

11. November 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/D/03/03165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/7088 A61K38/45 A61K39/395 A61K31/235 A61K31/355
A61K38/13 A61P5/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 197 40 384 A (MAX DELBRUECK CENTRUM) 11 March 1999 (1999-03-11) the whole document	1-18, 22-24, 30-55
X	MENNE J ET AL: "Protein kinase C alpha deficiency ameliorates the development of diabetic nephropathy in mice with streptozotocin-induced hyperglycemia" KIDNEY AND BLOOD PRESSURE RESEARCH, vol. 24, no. 4-6, 2001, page 231, XP008029527 Joint Scientific Meeting of the Nephrology Society and the German Working Group for Clinical Nephrol; Munster, Germany; September 29-October 02, 2001 ISSN: 1420-4096 Zusammenfassung V43	1-18, 22-24, 30-55

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 2004

Date of mailing of the international search report

08 SEP 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/03165

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MENNE JAN ET AL: "Proteinkinase C alpha deficiency ameliorates the development of diabetic nephropathy in mice with streptozotocin-induced hyperglycemia"</p> <p>JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, vol. 12, no. Program and Abstract Issue, September 2001 (2001-09), page 151A, XP008029528</p> <p>ASN (American Society of Nephrology)/ISN (International Society of Nephrology) World Congress of Nep; San Francisco, CA, USA; October 10-17, 2001 ISSN: 1046-6673 Zusammenfassung A0791</p>	1-18, 22-24, 30-55
P,X	<p>MEIER MATTHIAS ET AL: "Knockout of protein kinase C alpha protects against the development of albuminuria but not renal hypertrophy."</p> <p>DIABETES, vol. 52, no. Supplement 1, 2003, page A50, XP008029526</p> <p>63rd Scientific Sessions of the American Diabetes Association; New Orleans, LA, USA; June 13-17, 2003 ISSN: 0012-1797 (ISSN print) Zusammenfassung 215-OR</p>	1-18, 22-24, 30-55
A	<p>KANG NINGLING ET AL: "Differential expression of protein kinase C isoforms in streptozotocin-induced diabetic rats"</p> <p>KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 56, no. 5, November 1999 (1999-11), pages 1737-1750, XP002278386 ISSN: 0085-2538</p> <p>page 1737, right-hand column, paragraph 1 - page 1738, left-hand column, paragraph 1 page 1739, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 page 1745, left-hand column, paragraph 1 - page 1747, left-hand column, paragraph 2 page 1748, left-hand column, paragraph 2</p>	
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2000, CARMO ANALIA ET AL: "Effect of cyclosporin-A on the blood-retinal barrier permeability in streptozotocin-induced diabetes"</p> <p>XP002278387 Database accession no. PREV200100092751 abstract</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-7, 28, 29, 45-47, 50, 53-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/03/03165

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>& MEDIATORS OF INFLAMMATION, vol. 9, no. 5, 2000, pages 243-248, ISSN: 0962-9351</p> <p>-----</p> <p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; June 1998 (1998-06), KOYA DAISUKE ET AL: "Protein kinase C activation and the development of diabetic complications" XP002292425 Database accession no. PREV199800300736 abstract</p> <p>& DIABETES, vol. 47, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 859-866, ISSN: 0012-1797</p> <p>-----</p>	1-9, 25, 26, 30-55
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 23 October 2001 (2001-10-23), VENUGOPAL SENTHIL KUMAR ET AL: "alpha-Tocopherol inhibits hyperglycemia-induced superoxide anion release from human monocytes via inhibition of PKC-alpha" XP008034017 Database accession no. PREV200200276157 abstract</p> <p>-----</p>	1-9, 25, 26, 30-55
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; September 1997 (1997-09), HEMPEL A ET AL: "High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha." XP002292426 Database accession no. NLM9285638 abstract</p> <p>& CIRCULATION RESEARCH. SEP 1997, vol. 81, no. 3, September 1997 (1997-09), pages 363-371, ISSN: 0009-7330</p> <p>-----</p>	1-9, 19-21, 30-55
X	<p>US 5 674 902 A (SZALLASI ZOLTAN ET AL) 7 October 1997 (1997-10-07) claim 1</p> <p>-----</p>	50-55
X	<p>US 6 063 814 A (HAN ZHENG TAO ET AL) 16 May 2000 (2000-05-16) claim 1</p> <p>-----</p>	50-55

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/03165

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; June 1996 (1996-06), BUSUTTIL S J ET AL: "Antisense suppression of protein kinase C-alpha and -delta in vascular smooth muscle." XP002292427 Database accession no. NLM8661186 cited in the application abstract & THE JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH. JUN 1996, vol. 63, no. 1, June 1996 (1996-06), pages 137-142, ISSN: 0022-4804</p>	
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; September 2001 (2001-09), TAKAHASHI TOMOYA ET AL: "Cyclosporin A promotes hair epithelial cell proliferation and modulates protein kinase C expression and translocation in hair epithelial cells" XP002292428 Database accession no. PREV200100483758 cited in the application abstract & JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 117, no. 3, September 2001 (2001-09), pages 605-611, ISSN: 0022-202X</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 03/03165

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see supplemental sheet
2. ☒ Claims Nos.: **27**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see supplemental sheet
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box I.1

Although claims 1 to 44 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

Box I.2

Claim 27

Invention 1 (claims 1 to 9, 30 to 55 (in part), claims 10 to 18 (in full)):

The current claims 1 to 10, 13 to 18, 30 to 48, 50, 51 and 53 to 55 relate to compounds each characterised by a desirable attribute or property, as follows:
compounds that reduce or inhibit the expression and/or activity of the protein kinase C-alpha; the compounds being nucleic acids that reduce or inhibit the expression of the protein kinase C-alpha gene; and possibly further the nucleic acid being able to inhibit the expression of the human protein kinase C-alpha gene in a host cell in antisense orientation to a promoter.

The claims therefore encompass all compounds, etc. that have this attribute or property, yet the application provides support in the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products, etc.. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Regardless of the above, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the compounds in terms of the result which is to be achieved. Again, this lack of clarity is such that it is not possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported and disclosed in the above sense, namely the parts relating to the compounds of claims 11, 12, 49 and 52.

Invention 2 (claims 1 to 9, 30 to 55 (in part), claims 19 to 27 (in full)):

The current claims 1 to 9, 19, 25, 27 and 30 to 55 relate to compounds each characterised by a desirable attribute or property, as follows:
compounds that reduce or inhibit the expression and/or activity of the protein kinase C-alpha; and the compounds reducing or inhibiting the expression of the protein kinase C-alpha, inhibiting the translocation of the protein kinase C-alpha, antagonising protein kinase C-alpha activity or inhibiting protein kinase C-alpha activity.

The claims therefore encompass all compounds, etc. that have this attribute or property, yet the application provides support in the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products, etc.. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Regardless of the above, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the compounds in terms of the result which is to be achieved. Again, this lack of clarity is such that it is not possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported and disclosed in the above sense, namely the parts relating to the compounds of claims 20 to 24 and 26.

Invention 3 (claims 1 to 7, 45 to 47, 50, 53 to 55 (in part), claims 28 and 29 (in full)):

The current claims 1 to 7, 28, 29, 45 to 47, 50 and 53 to 55 relate to compounds each characterised by a desirable attribute or property, as follows:
compounds that reduce or inhibit the expression and/or activity of the protein kinase C-alpha; and the compounds at the same time reducing or inhibiting the expression and/or activity of the protein kinase C-beta.

The claims therefore encompass all compounds, etc. that have this attribute or property, yet the application provides support in the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products, etc.. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Regardless of the above, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the compounds in terms of the result which is to be achieved. Again, this lack of clarity is such that it is not possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported and disclosed in the above sense, namely the parts relating to the compounds of claim 29.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the defects that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/03165

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
DE 19740384	A	11-03-1999	DE	19740384 A1	11-03-1999
US 5674902	A	07-10-1997	US	5420162 A	30-05-1995
			US	5405875 A	11-04-1995
			AU	1783092 A	02-11-1992
			WO	9217064 A2	15-10-1992
US 6063814	A	16-05-2000	AU	6968798 A	11-11-1998
			CA	2286557 A1	22-10-1998
			EP	0986378 A1	22-03-2000
			JP	2001520656 T	30-10-2001
			WO	9846218 A1	22-10-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/03165

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSSTANDES

IPK 7 A61K31/7088 A61K38/45 A61K39/395 A61K31/235 A61K31/355
A61K38/13 A61P5/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 197 40 384 A (MAX DELBRUECK CENTRUM) 11. März 1999 (1999-03-11) das ganze Dokument	1-18, 22-24, 30-55
X	MENNE J ET AL: "Protein kinase C alpha deficiency ameliorates the development of diabetic nephropathy in mice with streptozotocin-induced hyperglycemia" KIDNEY AND BLOOD PRESSURE RESEARCH, Bd. 24, Nr. 4-6, 2001, Seite 231, XP008029527 Joint Scientific Meeting of the Nephrology Society and the German Working Group for Clinical Nephrol; Munster, Germany; September 29-October 02, 2001 ISSN: 1420-4096 Zusammenfassung V43 ----- -/-	1-18, 22-24, 30-55

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. August 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08 SEP 2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sitch, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESCHENNE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MENNE JAN ET AL: "Proteinkinase C alpha deficiency ameliorates the development of diabetic nephropathy in mice with streptozotocin-induced hyperglycemia" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, Bd. 12, Nr. Program and Abstract Issue, September 2001 (2001-09), Seite 151A, XP008029528 ASN (American Society of Nephrology)/ISN (International Society of Nephrology) World Congress of Nep; San Francisco, CA, USA; October 10-17, 2001 ISSN: 1046-6673 Zusammenfassung A0791</p>	1-18, 22-24, 30-55
P,X	<p>MEIER MATTHIAS ET AL: "Knockout of protein kinase C alpha protects against the development of albuminuria but not renal hypertrophy." DIABETES, Bd. 52, Nr. Supplement 1, 2003, Seite A50, XP008029526 63rd Scientific Sessions of the American Diabetes Association; New Orleans, LA, USA; June 13-17, 2003 ISSN: 0012-1797 (ISSN print) Zusammenfassung 215-OR</p>	1-18, 22-24, 30-55
A	<p>KANG NINGLING ET AL: "Differential expression of protein kinase C isoforms in streptozotocin-induced diabetic rats" KIDNEY INTERNATIONAL, Bd. 56, Nr. 5, November 1999 (1999-11), Seiten 1737-1750, XP002278386 ISSN: 0085-2538 Seite 1737, rechte Spalte, Absatz 1 - Seite 1738, linke Spalte, Absatz 1 Seite 1739, linke Spalte, Absatz 3 - rechte Spalte, Absatz 1 Seite 1745, linke Spalte, Absatz 1 - Seite 1747, linke Spalte, Absatz 2 Seite 1748, linke Spalte, Absatz 2</p>	
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2000, CARMO ANALIA ET AL: "Effect of cyclosporin-A on the blood-retinal barrier permeability in streptozotocin-induced diabetes" XP002278387 Database accession no. PREV200100092751 Zusammenfassung -/--</p>	1-7, 28, 29, 45-47, 50, 53-55

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESCHENNE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	& MEDIATORS OF INFLAMMATION, Bd. 9, Nr. 5, 2000, Seiten 243-248, ISSN: 0962-9351 ----- DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Juni 1998 (1998-06), KOYA DAISUKE ET AL: "Protein kinase C activation and the development of diabetic complications" XP002292425 Database accession no. PREV199800300736 Zusammenfassung & DIABETES, Bd. 47, Nr. 6, Juni 1998 (1998-06), Seiten 859-866, ISSN: 0012-1797 -----	1-9, 25, 26, 30-55
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 23. Oktober 2001 (2001-10-23), VENUGOPAL SENTHIL KUMAR ET AL: "alpha-Tocopherol inhibits hyperglycemia-induced superoxide anion release from human monocytes via inhibition of PKC-alpha" XP008034017 Database accession no. PREV200200276157 Zusammenfassung -----	1-9, 25, 26, 30-55
X	DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; September 1997 (1997-09), HEMPEL A ET AL: "High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha." XP002292426 Database accession no. NLM9285638 Zusammenfassung & CIRCULATION RESEARCH. SEP 1997, Bd. 81, Nr. 3, September 1997 (1997-09), Seiten 363-371, ISSN: 0009-7330 -----	1-9, 19-21, 30-55
X	----- US 5 674 902 A (SZALLASI ZOLTAN ET AL) 7. Oktober 1997 (1997-10-07) Anspruch 1 -----	50-55
X	----- US 6 063 814 A (HAN ZHENG TAO ET AL) 16. Mai 2000 (2000-05-16) Anspruch 1 -----	50-55
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGELEGENHEITEN UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; Juni 1996 (1996-06), BUSUTTIL S J ET AL: "Antisense suppression of protein kinase C-alpha and -delta in vascular smooth muscle." XP002292427 Database accession no. NLM8661186 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung & THE JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH. JUN 1996, Bd. 63, Nr. 1, Juni 1996 (1996-06), Seiten 137-142, ISSN: 0022-4804</p> <p>-----</p>	
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; September 2001 (2001-09), TAKAHASHI TOMOYA ET AL: "Cyclosporin A promotes hair epithelial cell proliferation and modulates protein kinase C expression and translocation in hair epithelial cells" XP002292428 Database accession no. PREV200100483758 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung & JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, Bd. 117, Nr. 3, September 2001 (2001-09), Seiten 605-611, ISSN: 0022-202X</p> <p>-----</p>	

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
 Obwohl die Ansprüche 1-44 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. 27
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
 siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 1-44 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 27

Betreffend Erfindung 1 (Ansprüche 1-9, 30-55 (teilweise), Ansprüche 10-18 ganz):

Die geltenden Patentansprüche 1-10, 13-18, 30-48, 50, 51, 53-55 beziehen sich auf Verbindungen jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, wie folgt:

Verbindungen, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C-alpha vermindern oder hemmen; und wobei die Verbindungen Nukleinsäure sind, die die Expression des Proteinkinase C alpha Gens vermindern oder hemmen; und eventuel weiter wobei die Nukleinsäure in einer Wirtszelle in Antisense-Orientierung zu einem Promoter die Expression des Gens der humanen Proteinkinase C-alpha hemmen kann.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Verbindungen usw., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verbindungen über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Verbindungen der Ansprüche 11, 12, 49, 52.

Betreffend Erfindung 2 (Ansprüche 1-9, 30-55 (teilweise), Ansprüche 19-27 (ganz)):

Die geltenden Patentansprüche 1-9, 19, 25, 27, 30-55 beziehen sich auf Verbindungen jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, wie folgt:

Verbindungen, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C-alpha vermindern oder hemmen; und wobei die Verbindungen die

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Expression der Proteinkinase C-alpha hemmen oder vermindern, die Translokation der Proteinkinase C alpha hemmen, die Proteinkinase C-alpha Aktivität antagonisieren, oder die Proteinkinase C-alpha Aktivität inhibieren.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Verbindungen usw., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verbindungen über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Verbindungen der Ansprüche 20-24, 26.

Betreffend Erfindung 3 (Ansprüche 1-7, 45-47, 50, 53-55 (teilweise), Ansprüche 28, 29 (ganz)):

Die geltenden Patentansprüche 1-7, 28, 29, 45-47, 50, 53-55 beziehen sich auf Verbindungen jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, wie folgt:

Verbindungen, die die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C-alpha vermindern oder hemmen; und wobei die Verbindungen gleichzeitig die Expression und/oder Aktivität der Proteinkinase C-beta vermindern oder hemmen.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Verbindungen usw., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verbindungen über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Verbindungen der Ansprüche 29

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/03/03165

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19740384	A	11-03-1999	DE	19740384 A1	11-03-1999
US 5674902	A	07-10-1997	US	5420162 A	30-05-1995
			US	5405875 A	11-04-1995
			AU	1783092 A	02-11-1992
			WO	9217064 A2	15-10-1992
US 6063814	A	16-05-2000	AU	6968798 A	11-11-1998
			CA	2286557 A1	22-10-1998
			EP	0986378 A1	22-03-2000
			JP	2001520656 T	30-10-2001
			WO	9846218 A1	22-10-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.